

2021

Efecto de la adición de Biochar como enmienda de un suelo degradado, sobre microorganismos relacionados con el ciclo del carbono

Johan Alejandro Burbano Chinchajoy
Universidad de La Salle, Bogotá, johanaburbano09@unisalle.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Agricultural Science Commons](#), [Agronomy and Crop Sciences Commons](#), [Biodiversity Commons](#), [Environmental Microbiology and Microbial Ecology Commons](#), [Forest Biology Commons](#), and the [Forest Management Commons](#)

Citación recomendada

Burbano Chinchajoy, J. A. (2021). Efecto de la adición de Biochar como enmienda de un suelo degradado, sobre microorganismos relacionados con el ciclo del carbono. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/123>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE BIOCHAR COMO ENMIENDA DE UN SUELO
DEGRADADO, SOBRE MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON EL
CICLO DEL CARBONO**

JOHAN ALEJANDRO BURBANO CHINCHAJÓY

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C – COLOMBIA
2021**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE BIOCHAR COMO ENMIENDA DE UN SUELO
DEGRADADO, SOBRE MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON EL
CICLO DEL CARBONO**

JOHAN ALEJANDRO BURBANO CHINCHAJÓY

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

DIRECTOR

**JAIRO VANEGAS GORDILLO
QUÍMICO**

COTUTORA

**LUCÍA CRISTINA LOZANO ARDILA
MICROBIÓLOGA M.Sc. Ph. D**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C – COLOMBIA
2021**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las partes involucradas en el desarrollo de este trabajo de grado, por el apoyo constante, de familiares, amigos y profesores. Por tanto, a mis padres, gracias por ser uno de los pilares en mi vida y brindarme consejos para seguir estudiando. Además, a Juanes mi mascota, por estar siempre conmigo, su apoyo, lealtad y compañía en momentos difíciles.

A mis tutores Jairo Vanegas y Lucia Lozano, por aterrizar las ideas que se plasmaron en este trabajo de grado. Por toda su paciencia, experiencia y enseñanza profesional, que ayudaron a fortalecer mi visión de la biología en las áreas de la química y microbiología.

En general a mis amigos, gracias a ellos conviví con grandes personas y aprendí a formar mejores relaciones personales, además de sus consejos, lecciones y recomendaciones para escribir en este trabajo.

Agradecer a todos los profesores del programa de Biología de la Universidad de la Salle, por formarme como biólogo, para entender y contemplar la naturaleza desde una visión más amplia. Así como también a los técnicos de laboratorio, por su colaboración a todos los estudiantes en los espacios de investigación.

A Wilson de la Alcaldía de Sibaté por ser el intermediario en la búsqueda y comunicación con agricultores del municipio, así mismo al señor Noé, propietario de la finca El escondite por permitirnos un espacio para desarrollar esta investigación.

Finalmente, quiero agradecer al programa Ser pilo paga por brindarme la oportunidad de estar en un pregrado.

Tabla de contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS	3
GENERAL	3
ESPECÍFICOS	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
ÁREA DE ESTUDIO	4
FASE 1. MUESTREO Y ADECUACIÓN DEL SUELO PARA BIOENSAYO EN CAMPO	5
Instalación y caracterización del sitio de muestreo	5
Caracterización y adición de biochar en campo.....	6
FASE 2. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO	7
Evaluación fisicoquímica del suelo con enmiendas de biochar	7
Contenido de carbono orgánico de suelo	8
Variación de la precipitación.....	8
FASE 3. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	8
Ensayo de respiración.....	8
Recuento de microorganismos	9
Diversidad de morfotipos	10
RESULTADOS	11
FASE 1. MUESTREO Y ADECUACIÓN DEL SUELO PARA BIOENSAYO EN CAMPO	11
Instalación y caracterización del sitio de muestreo	11
Caracterización y adición de biochar en campo.....	13
FASE 2. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO	14
Evaluación fisicoquímica del suelo con enmiendas de biochar	14
Contenido de carbono orgánico de suelo	19
Variación de la precipitación.....	21
FASE 3. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	21
Ensayo de respiración.....	21

Recuento de microorganismos	22
Diversidad de microorganismos.....	24
DISCUSIÓN.....	27
FASE 1. MUESTREO Y ADECUACIÓN DEL SUELO PARA BIOENSAYO EN CAMPO	27
Instalación y caracterización del sitio de muestreo	27
Caracterización y adición de biochar en campo.....	27
FASE 2. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO	28
Evaluación fisicoquímica de la enmienda de biochar en suelo	28
Contenido de carbono orgánico del suelo	31
FASE 3. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	32
Ensayo de respiración.....	32
Diversidad de microorganismos.....	33
CONCLUSIONES.....	36
RECOMENDACIONES	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

Lista de figuras

Figura 1. Ubicación del área de estudio a. Colombia. b. Departamento de Cundinamarca. c. Municipio de Sibaté. d. Vereda San Benito, Finca “El Escondite”	4
Figura 2. Separación de las parcelas para los tratamientos y control. (Izq) Foto del sitio. (Der) Esquema representativo de las divisiones de los tratamientos	6
Figura 3. Adición de biochar en campo a. Proceso de adición de biochar. b. Parcelas con adición de biochar 1% y 3%	7
Figura 4. Parámetros fisicoquímicos sensibles al efecto del biochar. A. Porcentaje de materia orgánica. B. Porcentaje de C-orgánico. C. pH. D. CIC Capacidad de intercambio catiónico	18
Figura 5. Parámetros fisicoquímicos secundarios al efecto del biochar. A. Fósforo (P) B. Potasio (K) C. N-NO ₃ ⁻ Nitratos D. N- NH ₄ ⁺ Amonio	19
Figura 6. Precipitación por meses en el municipio de Sibaté del periodo 2019 a 2020, Fuente de datos: IDEAM.....	21
Figura 7. Riqueza de morfotipos presentes en medios de cultivo de las muestras de suelo inicial (A) y los tratamientos de la muestra final (B)	25
Figura 8. Abundancias de morfotipos presentes en Agar Nutritivo del muestreo inicial y tratamientos de la muestra final.....	26

Lista de tablas

Tabla 1. Cantidades de biochar usadas en los tratamientos en campo	7
Tabla 2. Características fisicoquímicas del suelo en las cuatro parcelas del sitio para bioensayo	12
Tabla 3. Análisis fisicoquímico del biochar	13
Tabla 4. Características fisicoquímicas del suelo con adición de biochar de tres fechas de muestreo en campo	16
Tabla 5. Contenido de carbono orgánico del suelo	20
Tabla 6. Contenido de carbono orgánico almacenado en los tratamientos	21
Tabla 7. Acumulación de CO ₂ de la muestra inicial y los tratamientos del muestreo final .	22
Tabla 8. Recuentos diferenciales de morfotipos de microorganismos en la muestra inicial de suelo.....	22
Tabla 9. Recuento de morfotipos de microorganismos en la muestra final de los tratamientos con biochar	23
Tabla 10. Índices de diversidad para los microorganismos heterótrofos de la muestra inicial y tratamientos de la muestra final.....	27

RESUMEN

Actualmente, la fuerte demanda agrícola y las malas prácticas han alterado el equilibrio natural del suelo, así como las interacciones físicas, químicas y biológicas, ocasionando su degradación del suelo; por tanto, los índices de calidad del suelo son considerados como herramientas para evaluar el estado de este sustrato en condiciones naturales o el utilizado para la producción agrícola. Una de las prácticas utilizadas para mitigar su degradación es el uso de enmiendas orgánicas, como el biochar, a nivel mundial se ha evaluado su adición como medio para mejorar la fertilidad del suelo y mitigar el cambio climático, además, sus efectos en parámetros biológicos del suelo han empezado a ser cada vez más relevantes, en conjunto con sus efectos sobre propiedades fisicoquímicas del suelo. El objetivo de este estudio fue, evaluar el uso de biochar como enmienda de suelo degradado, sobre microorganismos relacionados con la transformación del carbono, para esto, se tomaron muestras de suelo de una localidad agrícola de Sibaté, en el departamento de Cundinamarca-Colombia, en donde se realizó un ensayo con 1%, 3% y 5% de biochar, como tratamientos y el control negativo al cual no se le adicionó ninguna enmienda. A través de muestras de suelo se evaluaron parámetros fisicoquímicos, composición de microorganismos indicadores de transformaciones de carbono y diversidad de microorganismos heterótrofos, durante un periodo de un año de evolución del biochar en suelo degradado. Los resultados indicaron la disminución tanto del contenido de carbono orgánico como de materia orgánica, pero sin diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Se evidenció la reducción del pH hasta el tercer muestreo y aumento hasta el cuarto muestreo. Así mismo, se evidenció la disminución de los nitratos del suelo hasta el tercer mes en los tratamientos y control, con un efecto tardío en el periodo de 9 meses finales los tratamientos aumentaron sus valores y se diferenciaron del control que permaneció constante en el año de evaluación. Se reporta, un cambio en la riqueza de morfotipos y mayor abundancia de un morfotipo presente en Agar nutritivo del tratamiento al 3%. Sin embargo, se presentó baja diversidad de microorganismos heterótrofos en Agar nutritivo para la muestra inicial, tratamientos y control. Por lo tanto, se espera que la adición de biochar como enmienda para el suelo, sea una opción a futuro para promover estrategias de mitigación de suelos degradados y mejorar el manejo agroindustrial de residuos.

Palabras clave: Suelos, biochar, parámetros fisicoquímicos, microorganismos, diversidad.

INTRODUCCIÓN

La degradación de suelos es un fenómeno provocado por la reducción acelerada de productividad, funcionalidad y la capacidad de resiliencia¹⁻³, debido a la alteración de interacciones físicas, químicas y biológicas⁴⁻⁶. Adicionalmente, esta pérdida de la productividad del suelo ha hecho menos eficientes los servicios ecosistémicos de cultivos agrícolas, donde se estima que hasta 500 millones de hectáreas se han visto comprometidas en los trópicos; así mismo, a nivel mundial, el 33% de la superficie está afectada por algún tipo de degradación del suelo^{7,8}. Adicionando que esta degradación también puede llegar a frenar el desarrollo económico de países donde el sustento principal es la agricultura, además de los diversos impactos ambientales que pueden generarse y los riesgos para la salud que son consecuencia de la erosión del suelo y otros procesos de degradación⁹⁻¹¹.

Una consecuencia de la degradación del suelo, se ve reflejada sobre los procesos biológicos, que ha conllevado a una disminución de la actividad de microorganismos, lo que ha afectado los ciclos biogeoquímicos^{12,13}, debilitando la disponibilidad y absorción de nutrientes por las plantas. Dentro de las prácticas utilizadas para mitigar su degradación, se encuentran el aporte de enmiendas orgánicas y residuos de cosechas, optimización del uso de fertilizantes y la preservación de suelos agrícolas productivos¹⁴, son algunas modalidades usadas, debido a la elevada capacidad de amortiguación del suelo¹⁵.

Recientemente, el interés por las aplicaciones de biochar en el suelo ha crecido¹⁶, siendo este un material rico en carbono de bajo costo, que se produce por la conversión termoquímica de biomasa en ausencia de oxígeno¹⁷⁻²². El biochar tiene compuestos recalcitrantes de carbono que podrían funcionar como reserva de larga duración de este elemento en suelos, lo cual retarda el retorno a la atmósfera como CO₂, lo que contribuye a mitigar el cambio climático. Adicionalmente sería una alternativa para el tratamiento de residuos agrícolas por su gran volumen de producción que se aprovecharían como biochar en diversas áreas de investigación^{21,23,24}.

Durante la producción de biochar, se generan estructuras que le brindan alta porosidad y gran capacidad de adsorción de gases^{25,26}, que cuando es utilizado como enmiendas de suelo de lugar a mejores condiciones físicas, como la estructura y la estabilidad para el aumento de la aireación del suelo, condiciones químicas como mayor capacidad de intercambio catiónico por la disponibilidad de nutrientes, el aumento de la relación carbono-nitrógeno y mejoramiento del pH^{27,28}. Al mismo tiempo a nivel biológico crea un espacio favorable para algunos grupos de microorganismos que favorecen en el alivio de tensiones ambientales causados por la industria agrícola, mediados por cambios en la comunidad y biomasa microbiana²⁹⁻³¹. Además, se ha prestado atención a la promoción y protección de agregados del suelo, con los cuales se da la garantía para la adsorción, asimilación, transformación y formación de la materia orgánica del suelo por parte de los microorganismos³²⁻³⁴.

El establecimiento de indicadores que miden la calidad del suelo con adiciones de biochar,

son muy prácticos, como son los parámetros fisicoquímicos, como textura, pH, capacidad de intercambio catiónico, los cuales han logrado dar una aproximación del efecto en suelos, pero no representan la totalidad de un análisis. Se ha optado por la alternativa de los indicadores biológicos, puesto que son herramientas que pueden ofrecer una medida temprana del grado de mejoría, perturbación o estrés ocasionado^{35,36}.

Los parámetros biológicos y bioquímicos están adquiriendo un gran significado debido a la importancia del microbioma de los suelos en procesos de ciclaje y disponibilidad de nutrientes para las plantas, por el sistema complejo de su diversidad y su mayor auge³⁷. Los indicadores existentes se basan principalmente en parámetros tradicionales como el contenido de C y N de la biomasa microbiana, respiración del suelo, patrones de actividad microbiana global y/o potencial, y ensayos que determinan la actividad enzimática³⁸; los cuales pueden ser útiles en estudios de suelos naturales, donde los procesos de mineralización, descomposición y humificación de la materia orgánica tienen la posibilidad de ser monitoreados a través de indicadores de la actividad metabólica de estos y también son apropiados para sistemas agrícolas^{13,39-41}.

Actualmente en Colombia son muy escasos los estudios del efecto del biochar sobre microorganismos en el ciclo del carbono. Es por esto que esta investigación propone evaluar el impacto de biochar como enmienda para la recuperación de propiedades biológicas en suelos degradados debido a varios factores importantes, la fácil aplicación en la industria agrícola, la capacidad de acción durante largos y cortos periodos de tiempo, la compleja red de interacciones con la biota del suelo y restablecer la resiliencia del suelo^{30,42-44}.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el uso de biochar como enmienda orgánica en un suelo degradado y su efecto sobre los microorganismos relacionados con la transformación del carbono.

ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la adición de biochar sobre las características fisicoquímicas del suelo.
- Cuantificar el efecto de la adición de biochar en poblaciones de microorganismos indicadores de la transformación de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

La zona en la que se desarrolló el presente estudio se encuentra en el área rural del municipio de Sibaté, departamento de Cundinamarca, en la vereda San Benito finca “El Escondite” ($4^{\circ}29'28.0''\text{N}$ $74^{\circ}14'47.7''\text{W}$) (Fig.1). Sibaté se encuentra a una altura de 2574 m.s.n.m y su temperatura promedio es de 14°C , su clima es frío y húmedo; la precipitación media anual es de 964.5 mm, incrementando hacia el suroeste con un régimen pluviométrico bimodal con dos períodos lluviosos en el año, separados por dos períodos de relativa sequía⁴⁵.

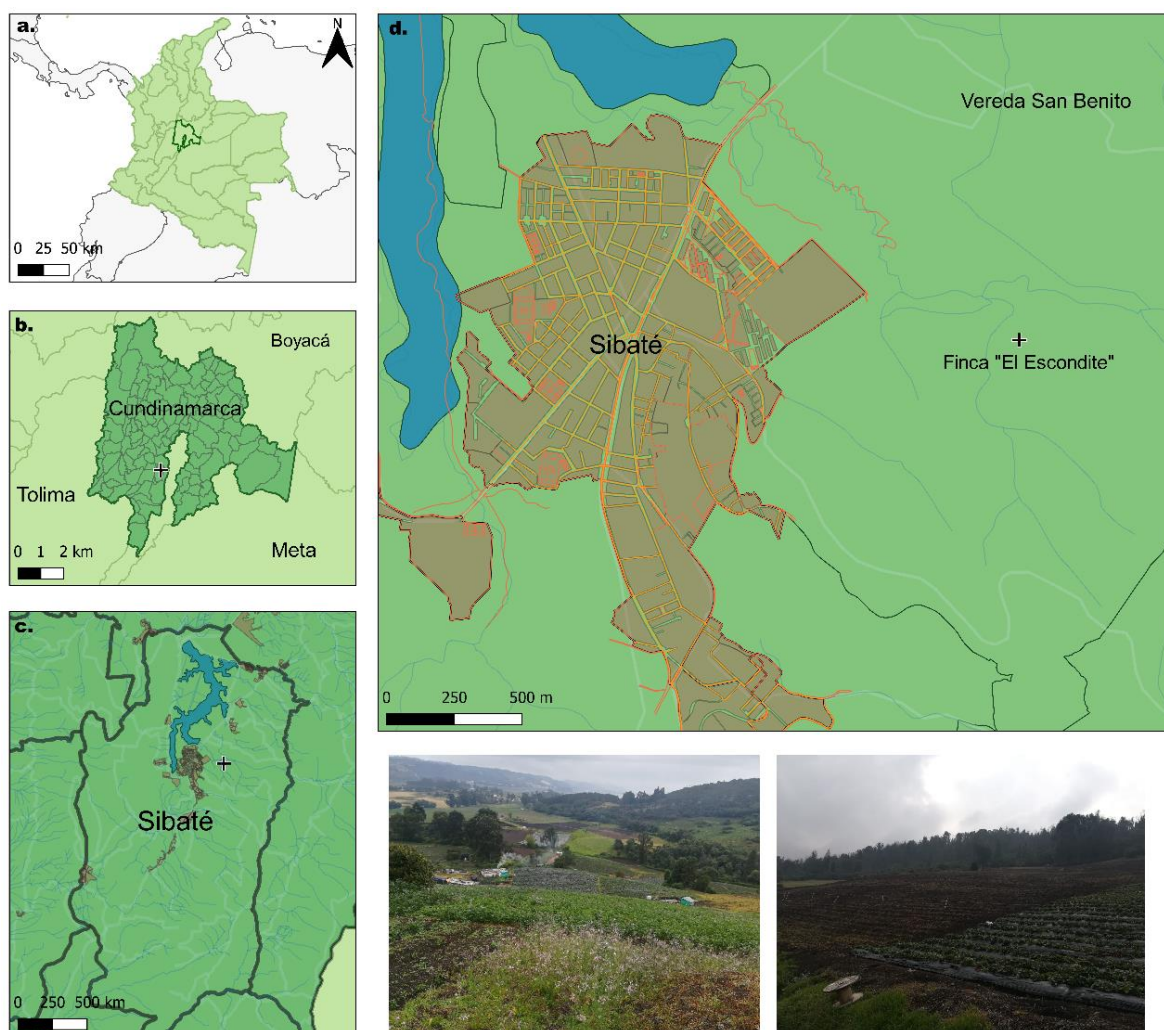


Figura 1. Ubicación del área de estudio a. Colombia. b. Departamento de Cundinamarca. c. Municipio de Sibaté. d. Vereda San Benito, Finca “El Escondite”

Las zonas de vida presentes en el municipio de Sibaté, corresponden a bosque húmedo montano bajo (bh-MB), bosque muy húmedo montano bajo (bhm-MB) y páramo (P)⁴⁶, además se han clasificado 6 macrorelieves, montañoso estructural, montañoso denudativo,

mixto denudacional estructural, laderas coluviales, altiplano y valles aluviales intramontañosos, con una geomorfología caracterizada por la presencia de material sedimentario limo-arcillosos con areniscas, cenizas volcánicas y lutitas negras⁴⁷. Los suelos se destacan por presentar pH ligeramente ácido, moderado a baja saturación de aluminio, alta saturación de bases, moderados y altos contenidos de carbono orgánico, contenidos moderados de potasio y calcio, todo esto le confiere al suelo moderadas a altas características fértiles⁴⁸.

A pesar de tener diferentes clases de erosión y procesos de salinización⁴⁹, es un municipio con vocación de los suelos para conservación, forestal y sistemas agropecuarios controlados con producción de flores, hortalizas, cultivos transitorios y anuales, pastoreo de bovinos de leche y ovinos, con recomendación de hacer rotación de cultivos para conservar fertilidad y el perfil edáfico⁴⁶.

FASE 1. MUESTREO Y ADECUACIÓN DEL SUELO PARA BIOENSAYO EN CAMPO

La fase de campo se desarrolló durante un periodo de 1 año, la toma de muestras inició en el mes de octubre de 2019 para conocer el estado del suelo y se realizó la adición de biochar, seguido de un monitoreo en los meses de diciembre de 2019, enero 2020 y octubre 2020.

Instalación y caracterización del sitio de muestreo

El experimento se llevó a cabo siguiendo la guía de muestreo para suelos del IGAC⁵⁰, por lo tanto se procedió con identificar el área de trabajo, teniendo características similares en cuanto al grado de inclinación y edad de explotación (cultivos anteriores), la zona tuvo un manejo previo de arado con tractor, puesto que no se le había dado uso al terreno en meses y se disponían a cultivar. Seguidamente se delimitó el terreno con estacas y cuerdas en 4 parcelas (5m x 5m) con separación de 1m entre cada una; de modo que 3 parcelas se dispusieron de forma vertical a la pendiente y una adicional que no presentara interacción con las otras para el control (Fig.2).

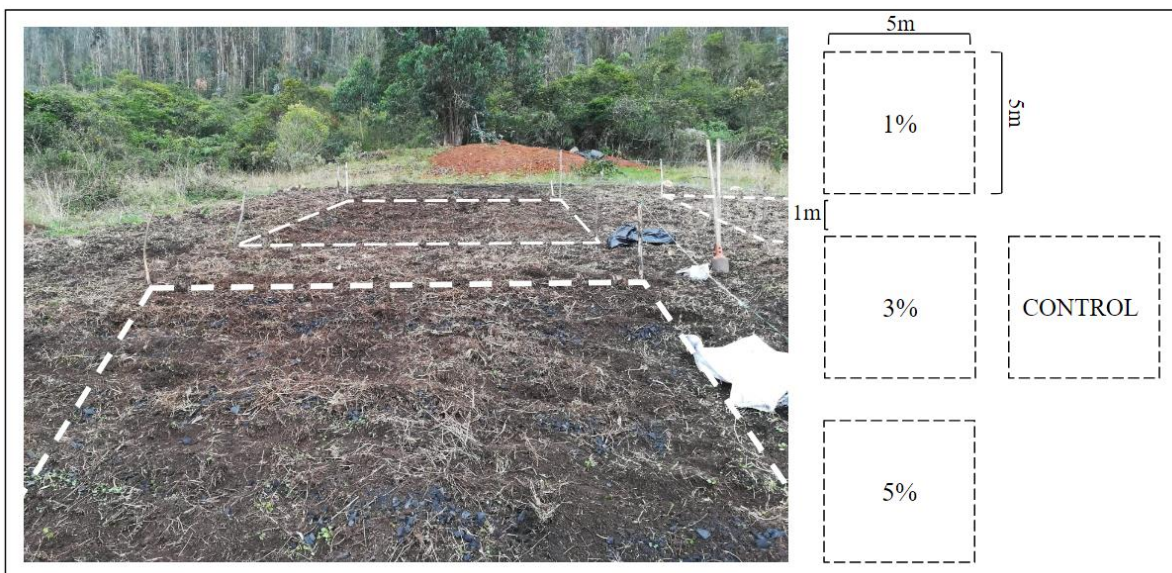


Figura 2. Separación de las parcelas para los tratamientos y control. (Izq) Foto del sitio. (Der) Esquema representativo de las divisiones de los tratamientos

Se tomaron muestras de suelo en zig-zag de cada parcela con una profundidad de 10-20cm donde se encuentra la capa de crecimiento aerobio mediante el uso de una paladraga para mantener las mismas cantidades de muestra por punto, adicional con el apoyo de un balde se procedió a mezclar todas las submuestras por parcela y formar una muestra compuesta homogénea. Se empacó aproximadamente 1 kg en bolsas plásticas resellables, identificadas con la fecha y zona de extracción, para ser procesadas mediante caracterización fisicoquímica en laboratorio certificado (laboratorio Nacional de Suelos del IGAC) y 1kg adicional para realizar los análisis microbiológicos en la Universidad de la Salle.

Caracterización y adición de biochar en campo

El material que se utilizó para producir biochar fueron residuos de flores, que fueron transformados mediante un proceso de pirolisis que requiere altas temperaturas (350-400°C) en una atmósfera controlada de oxígeno, se obtiene un material rico en carbono con diferentes propiedades físicas como químicas con numerosas aplicaciones en diferentes campos. Para su caracterización se realizó un Análisis de Materiales Orgánicos en el laboratorio de Suelos y Aguas del centro de bio-sistemas de la Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Para realizar la adición de biochar en las 3 parcelas seleccionadas, se usó el porcentaje de 1%, 3% y 5% de la masa de la parcela para cuantificar la cantidad de biochar aplicado al suelo (Tabla 1), de esta manera, la masa de suelo se encontró con el volumen de una parcela multiplicando sus dimensiones por la densidad aparente tomada de la caracterización fisicoquímica inicial³⁹. El proceso de adición de biochar se realizó mediante la extensión

homogénea sobre la superficie de la parcela, incorporando el biochar a 15-20cm superficiales del suelo con aplicación manual (Fig.3) y el control se definió como una parcela sin adición.

Tabla 1. Cantidades de biochar usadas en los tratamientos en campo

Tratamiento	Cantidad de biochar (Kg)
Control	0
1%	11.25
3%	33.75
5%	56.25

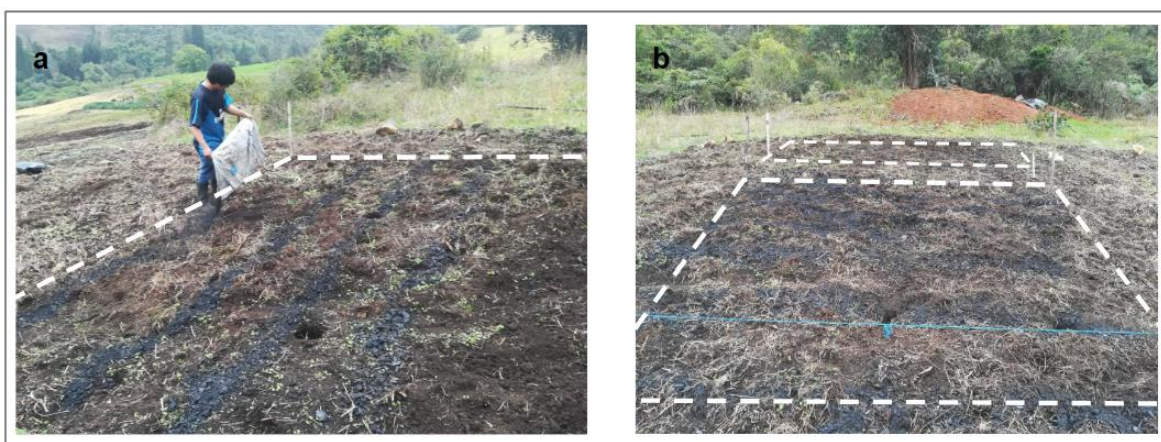


Figura 3. Adición de biochar en campo a. Proceso de adición de biochar. b. Parcelas con adición de biochar 1% y 3%

FASE 2. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO

Evaluación fisicoquímica del suelo con enmiendas de biochar

De acuerdo con la fase de campo, se procedió a extraer una muestra de suelo de cada una de las aplicaciones de biochar (1%, 3% y 5%) incluyendo el control, después de iniciado el tratamiento con biochar. Se realizaron los respectivos análisis fisicoquímicos, para las muestras iniciales de octubre (2019) de suelos se requirieron los servicios del laboratorio Nacional de Suelos del IGAC con el paquete analítico Q-01 para suelos. Para las muestras de diciembre (2019), enero y octubre (2020), se solicitaron los análisis de Fertilidad en Suelos en el laboratorio de Suelos y Aguas del centro de bio-sistemas de la Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano. Se realizó el análisis de datos con gráficas de líneas para visualizar la tendencia de los datos en el tiempo, mediante el software Graphpad Prism versión 8.0.1.

Contenido de carbono orgánico de suelo

Se tomaron 4 muestras de suelo durante el proceso, enfocándose en la medición de carbono orgánico, acuerdo con la guía para la determinación de Carbono en pequeñas propiedades rurales⁵¹.

El carbono almacenado en el suelo se calcula por medio de cada horizonte definido por medio de.

$$COS = [COS] * densidad\ aparente * profundidad * (1 - frag) * 10$$

Donde:

COS = Contenido de carbono orgánico del suelo del tipo de uso del suelo (t C/ha).

[COS] = concentración de carbono orgánico del suelo para una determinada masa de suelo obtenida del análisis de laboratorio (g C /kg de suelo)

Densidad aparente = masa de suelo por volumen de muestra (t de suelo m⁻³)

Profundidad = profundidad del horizonte o espesor de la capa de suelo, en metros (m)

frag = volumen porcentual de fragmentos gruesos/100, sin dimensiones.

Obs.: se utiliza el multiplicador final 10 para convertir las unidades en t C/ ha

Considerando para cada una de las etapas las cantidades de carbono presentes, se debe calcular el total de carbono durante el desarrollo del proyecto⁵², mediante la siguiente ecuación:

$$Incremento\ de\ Carbono = COS_2 - COS_1$$

Donde:

COS₂ = Cantidad de carbono orgánico final en el área trabajada (tC/ha)

COS₁ = Cantidad de carbono orgánico inicial en el área trabajada (tC/ha)

Variación de la precipitación

Se solicitaron datos de precipitación diaria de dos estaciones pluviométricas, preventivo infantil [21201310] y Unión LA [21201320], del periodo comprendido entre enero 2019 a octubre 2020, se procesaron para tener en cuenta el efecto de las precipitaciones sobre los tratamientos con biochar y el control.

FASE 3. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

Ensayo de respiración

Para las muestras tomadas en octubre de 2019 y octubre 2020, la variable evaluada fue la emisión de CO₂ después de 10 días de incubación a 25°C, las unidades experimentales fueron frascos de vidrio de 20ml con 10g de suelo de las muestras de suelo de cada parcela. La

producción de CO₂ se midió usando el método de incubación en medio cerrado con 10ml de NaOH 1N, se precipitaron los carbonatos (CO₃²⁻) con 10ml de BaCl₂ al 2% y se tomó el desprendimiento de CO₂ mediante titulación con HCl 0.5N con la disposición de tres gotas de fenolftaleína al 1%. Se consideró un blanco, sin la adición de sustrato, para controlar la presencia de CO₂ dentro de las cámaras estando en la incubadora⁵³⁻⁵⁵.

La reacción en la cual el CO₂ absorbido es: $\text{CO}_2 + 2\text{NaOH} = \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$

Para el ensayo de respiración se determina la diferencia entre la cantidad de NaOH inicial y el remanente después de la exposición al CO₂, posteriormente para calcular la cantidad de gas producido por respiración mediante la fórmula^{53,56}:

$$R = (B - M) \cdot N \cdot E$$

Donde:

R = Respiración microbiana en mg CO₂

B = Volumen de ácido necesario para titular el NaOH del promedio de los blancos (en mL)

M = Cantidad de ácido necesaria para titular el NaOH de la muestra (en mL)

N = Normalidad del ácido

E = Peso equivalente del CO₂ = 22

Recuento de microorganismos

Se procesaron las muestras de octubre de 2019 y octubre 2020, realizando diluciones seriadas en agua peptonada estéril, las cuales se sembraron en medios selectivos y diferenciales, como Agar Nutritivo para bacterias heterótrofas, medio PDA para hongos, Agar Carboximetil Celulosa (CMC) para microorganismos celulolíticos, medio Cetrimide para *Pseudomonas* spp, Agar Caseína-Almidón para actinobacterias. Las cajas fueron incubadas a temperatura de 25°C ± 2°C durante 1 semana^{57,58}.

Se realizó el revelado de los medios como CMC con rojo Congo y Agar Caseína-Almidón con Lugol, adicionalmente se realizó un recuento diferencial de los microorganismos, empleando características macroscópicas, entre ellas morfología de las colonias, pigmentación, tamaño, forma del borde, superficie de la colonia y consistencia; de esta manera se pudo establecer individuos y asignar morfotipos, para generar análisis de composición y diversidad en los tratamientos de biochar.

Diversidad de morfotipos

Riqueza y abundancia

Composición: El análisis de composición se llevó a cabo mediante tablas descriptivas que permiten comparar los morfotipos encontrados, su abundancia y el tratamiento de suelo del cual se obtuvo.

La riqueza se estimó mediante el conteo de morfotipos aislados en medios selectivos y diferenciales de cada tratamiento con biochar y el control. Se realizaron gráficos comparativos para relacionar el número de morfotipos por tratamiento mediante el software GraphpadPrism versión 8.0.1.

La abundancia de morfotipos asociados a los tratamientos, se calculó de acuerdo al total de morfotipos encontrados en agar nutritivo para bacterias heterótrofas. Para su análisis fue necesario elaborar gráficas de rango abundancia que fueron diseñadas por tratamiento, empleando el software GraphpadPrism versión 8.0.1.

Índices de diversidad alfa

A partir de los datos obtenidos, se evaluaron 4 índices de diversidad alfa, que determina la riqueza y abundancia de especies de una comunidad determinada que se considera homogénea, en este caso los morfotipos de bacterias heterótrofas de los tratamientos de biochar aplicados, empleando el software PAST versión 4.05. se calcularon los índices de dominancia, índice de Simpson, índice de Shannon-Wiener y equitatividad^{59,60}.

Dominancia: Se representa con valores cercanos a 1 que indica dominancia de una especie en la localidad, mientras que valores cercanos a 0 expresan igualdad en la distribución de las especies^{59,60}.

Índice de Simpson: Es un índice de dominancia, que toma la representatividad de las especies con mayor valor de importancia sin evaluar la contribución del resto de las especies, determinando la probabilidad de que dos individuos sacados al azar de una muestra correspondan a la misma especie, tiene un rango de 0 a 1, donde valores cercanos a 1, indican mayor diversidad del hábitat^{59,60}.

Índice de Shannon-Wiener: Es un índice de equidad, con el supuesto de que todas las especies están representadas uniformemente en las muestras y evalúa el grado de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una comunidad^{59,60}.

Equitatividad: Expresa el grado de uniformidad a partir de la abundancia de las especies. Toma valores cercanos a 0 para indicar las diferencias entre abundancia de taxones y baja diversidad, así mismos valores cercanos a 1 se relaciona con la igualdad de especies^{59,60}.

RESULTADOS

FASE 1. MUESTREO Y ADECUACIÓN DEL SUELO PARA BIOENSAYO EN CAMPO

Instalación y caracterización del sitio de muestreo

Las características químicas y físicas de los sitios de estudio se muestran compilados en la Tabla 2. Los análisis indicaron un tipo de textura Franco Arenosa, pero la parcela 3 presentó valores tipo Franco Arcilloso/Arena. El pH indico un suelo ligeramente ácido con valores entre 5.19 a 5.54. El porcentaje de carbono orgánico, carbono total y materia orgánica fue mayor en la parcela control, seguido de la parcela 1, 2 y 3 respectivamente. El nitrógeno total fue mayor para la parcela control con 0.57%, seguido de la parcela 2 con 0.49%, parcela 1 con 0.48 y parcela 3 con 0.47%. El fósforo disponible demostró valores de 14.23 mg/Kg de la parcela 1 y 12.71 mg/Kg para la parcela 3, la parcela control con 9.53 mg/Kg y la parcela 2 con 8.94 mg/Kg siendo el menor valor de Fósforo del muestreo inicial. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) demostró un mejor valor de 25.5 cmol(+)/Kg de la parcela 3, seguido del control, parcela 1 y 2 con 22.34, 21.749 y 20.201 cmol(+)/Kg respectivamente.

El contenido de los cationes básicos del suelo Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Potasio (K) y Sodio (Na), es diferente para cada parcela, pero el porcentaje de saturación de bases define mejor la retención de estos nutrientes en suelo, teniendo así, un porcentaje de 45.12%, 42.30%, 39.70% y 34.67%, de las parcelas control, 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Características fisicoquímicas del suelo en las cuatro parcelas del sitio para bioensayo

Muestreo 1 – Fisicoquímicos octubre 2019					
Parámetros	Unidades	Tratamientos			
		Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Control
Textura	-	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arcilloso/Arena	Franco Arenoso
pH	-	5.19	5.26	5.41	5.54
Acidez Inter	cmol(+)/Kg	0.66	0.58	0.44	0.25
S.A.I	%	6.73	6.7	4.78	2.44
Carbono Orgánico	%	4.446	4.395	4.206	5.138
Carbono Total	%	6.10	6.04	5.75	7.05
Materia Orgánica	%	7.66	7.57	7.25	8.85
Nitrógeno Total	%	0.48	0.49	0.47	0.57
Fósforo (P)	mg/Kg	14.23	8.94	12.71	9.53
CIC	cmol(+)/Kg	21.749	20.201	25.5	22.34
Calcio (Ca)	cmol(+)/Kg	6.46	5.38	5.79	6.7
Magnesio (Mg)	cmol(+)/Kg	1.6	1.5	1.61	2.07
Potasio (K)	cmol(+)/Kg	1.03	1.08	1.41	1.24
Sodio (Na)	cmol(+)/Kg	0.11	0.06	0.03	0.07
B.T	cmol(+)/kg	9.2	8.02	8.84	10.08
S.B	%	42.30	39.70	34.67	45.12

S.A.I: Saturación de acidez intercambiable. CIC: Capacidad de intercambio Catiónico. BT: Bases totales. SB: Saturación de bases

Caracterización y adición de biochar en campo

El análisis de materiales orgánicos del biochar indica un pH neutro de 7.40, cuenta con un 80.02% de materia orgánica y 36.88% carbono orgánico. La relación Carbono:Nitrógeno es de 158.76p:p, una conductividad eléctrica de 1.50dS/m. En unidades de Kg/Ton, el porcentaje de nitrógeno total representa 2.4%, Fósforo 1.8%, Potasio 0.9%, Calcio 2.7%, Magnesio 0.6% y Sodio 0.1%, se muestran estos resultados en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis fisicoquímico del biochar

Parámetro	Unidades	Biochar		
		Base húmeda	Base seca	Base húmeda (Kg/Ton)
Humedad	%	17.34	-	-
Densidad aparente	g*cm ⁻³	0.00	-	-
Carbono orgánico	%	36.88	44.61	-
Materia orgánica	%	80.02	96.81	-
Cenizas	%	-	3.19	-
Relación Carbono:Nitrógeno	p:p	158.76	158.76	-
pH (Reacción de acidez)	-logH ⁺	7.40	-	-
Conductividad eléctrica	dS/m	1.50	-	-
Nitrógeno total (N)	%	0.23	0.28	2.4
Fósforo (P)	%	0.09	0.11	1.8
Potasio (K)	%	0.14	0.17	0.9
Calcio (Ca)	%	0.17	0.21	2.7
Magnesio (Mg)	%	0.07	0.08	0.6
Sodio (Na)	%	0.017	0.21	0.1

FASE 2. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO

Evaluación fisicoquímica del suelo con enmiendas de biochar

A partir de los resultados fisicoquímicos del análisis de suelos, se realizó la tabla 4 donde se muestran los valores de cada parámetro evaluado en los tratamientos después de la adecuación de suelo con biochar. Los análisis muestran que las texturas no cambian de Franco-Arenoso en ningún momento del estudio. El pH disminuye después del muestreo inicial (Tablas 2 y 4), sobre los tratamientos 1%, 3%, 5% y control, a 4.6, 4.8, 4.9 y 5.1 (muestreo 2), y 4.7, 4.8, 4.9 y 4.9 (muestreo 3) respectivamente. Se produce un aumento en el muestreo 4 después de un año de tratamiento a valores de 5 para la adición al 1 y 3%, 5.1 para la adición al 5% y por último el control a 5.3.

El carbono orgánico disminuye sus porcentajes de 4.446, 4.395, 4.206 y 5.138 (Tabla 2.) a 3.91, 3.8, 3.81 y 3.9 (Tabla 4 – Muestreo 2) respectivamente de las adiciones al 1%, 3%, 5% y control. Seguido en el muestreo 3, hay cambios leves en sus porcentajes teniendo en la adición al 1% con 3.72%, adición al 3% con 3.9%, adición al 5% con 3.73% y control con 3.83%, para encontrar al transcurso de un año en el 4 muestreo, nuevamente una disminución de sus porcentajes a 2.99%, 3.13%, 2.95%, en las adiciones al 1%, 3% y 5% respectivamente y sobre el control a 3.15%.

La materia orgánica de los tratamientos sigue el mismo comportamiento del carbono orgánico, de sus porcentajes iniciales 7.66%, 7.57%, 7.25% y 8.85% de las adiciones al 1%, 3%, 5% y control (Tabla 2), disminuyen en 6 semanas (Tabla 4 – muestreo 2), a valores de 6.72% para la adición al 1%, 6.53% para adición al 3%, 6.55% para adición al 5% y 6.71% para el control. De la misma manera que en carbono orgánico, hay cambios leves para el transcurso de 12 semanas (Tabla 4 – muestreo 3), teniendo entonces, 6.4%, 6.71%, 6.42% y 6.59% respectivamente de las adiciones al 1%, 3%, 5% y control, a diferencia del periodo de un año, sus porcentajes vuelven a disminuir de forma considerable, a 5.15% de la adición al 1%, 5.38% de la adición al 3%, 5.07% de la adición al 5% y 5.42% para el control.

Se observa que hay menor acidez intercambiable sobre el control y en los tratamientos con mayores enmiendas en los muestreos 2 con valores entre 0.9 a 2.9 cmol(+)/Kg y 3 entre 0.84 a 0.6 cmol(+)/Kg, pero en el 4 los valores son diferentes con 0.48 cmol(+)/Kg para la adición al 1%, 0.57 cmol(+)/Kg para la adición al 3%, 0.35 cmol(+)/Kg para la adición al 5% y 0.28 cmol(+)/Kg para el control.

El fósforo (P) disponible en el suelo, después de la adición de biochar (Tabla 4 - Muestreo 2), muestra al control con 7 mg/Kg, las adiciones 1% y 5% con 6 mg/Kg, y 4 mg/Kg para la adición al 3%, a diferencia del ajuste en el muestreo 3, donde los valores son mejores para el control con 6 mg/Kg y los tratamientos con más adición de biochar, respectivamente 5, 4 y

3 mg/Kg. Al transcurso de un año de muestreo, biochar 5% presenta más disponibilidad de Fósforo que el control y las adiciones al 1% y 3%.

Los valores de capacidad de intercambio catiónico (CIC) después de la adición de biochar, van desde 20.4 hasta 28.5 cmol(+)/Kg entre los muestreos 2 y 4. La suma de los cationes básicos (Ca, Mg, K, Na) se obtienen las bases totales, de tal manera que el control, tiene valores de 9.96, 7.06 y 9.5 cmol(+)/Kg que están por encima de las adiciones en los tres muestreos. Por el otro lado las adiciones 1%, 3% y 5% tienen valores de 9.55, 6.91, 6.83 cmol(+)/Kg en el 2 muestreo, para el 3 muestreo valores de 6.61, 6.63 y 7.2 cmol(+)/Kg y para el 4 muestreo 6.76, 7.43 y 7.07.

Los valores de amonio (N-NH_4^+) al 2 muestreo, tienen valores de 21, 24.1, 22.9 mg/Kg para las adiciones a 1%, 3% y 5%, y el control presenta un valor de 21 mg/Kg. Con el 3 muestreo es notable la disminución en los valores de amonio, teniendo para la adición al 1% 17.8 mg/Kg, 3% y 5% 19.2 mg/Kg y para el control 19.3 mg/Kg. Siguiendo un patrón de disminución al año de iniciar el tratamiento, sobre el 4 muestreo se tienen valores de 14.8, 17, 14.2 y 13, para las adiciones al 1%, 3%, 5% y control respectivamente.

Finalmente, los valores nitratos (N-NO_3^-), los valores del control fueron, 5.2, 5.8 y 5.7 en los tres muestreos, no cambiaron considerablemente como los tratamientos con adiciones. La adición al 1% cuenta con un valor de 14 mg/Kg en el 2 muestreo, disminuye a 6.9 mg/Kg sobre las 12 semanas de adición de biochar y en el periodo de un año aumenta considerablemente a 18.8 mg/Kg. La adición al 3%, sobre el 2 muestreo se mantuvo con un valor bajo de 4.8 mg/Kg a diferencia de las otras adiciones, sobre el 3 muestreo sus valores aumentaron a 7.6 mg/Kg y finalmente con un valor de 22.7 mg/Kg en la muestra 4 a un año de tratamiento. Por último, la adición al 5%, sigue el mismo patrón que la adición al 1%, teniendo entonces en las primeras 6 semanas (2 Muestreo) un valor de 14.2 mg/Kg, seguido de una disminución a 5.7 mg/Kg a las 12 semanas y para el 4 muestreo de un año de tratamiento a 13.3 mg/Kg.

Tabla 4. Características fisicoquímicas del suelo con adición de biochar de tres fechas de muestreo en campo

Fisicoquímicos		Muestreo 2 - diciembre 2019				Muestreo 3 - enero 2020				Muestreo 4 - octubre 2020			
Parámetros	Unidades	Tratamientos				Tratamientos				Tratamientos			
		Biochar 1%	Biochar 3%	Biochar 5%	Control	Biochar 1%	Biochar 3%	Biochar 5%	Control	Biochar 1%	Biochar 3%	Biochar 5%	Control
Textura	-	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso
pH	-	4.6	4.8	4.9	5.1	4.7	4.8	4.9	4.9	5	5	5.1	5.3
C.E	dS/m	0.42	0.38	0.39	1.11	0.35	0.33	0.45	0.45	0.35	0.36	0.35	0.32
Carbono Orgánico	%	3.91	3.8	3.81	3.9	3.72	3.9	3.73	3.83	2.99	3.13	2.95	3.15
Materia Orgánica	%	6.72	6.53	6.55	6.71	6.4	6.71	6.42	6.59	5.15	5.38	5.07	5.42
S.B	%	79.5	76.4	74.2	81.6	77.4	82.4	76.3	80.5	82.8	80.9	86.9	91.1
Amonio (N- NH ₄ ⁺)	mg/Kg	21	24.1	22.9	21	17.8	19.2	19.2	19.3	14.8	17	14.2	13
Nitrato (N-NO ₃ ⁻)	mg/Kg	14	4.8	14.2	5.2	6.9	7.6	5.7	5.8	18.8	22.7	13.3	5.7
Fósforo (P)	mg/Kg	6	4	6	7	3	4	5	6	8	7	15	11
Acidez Inter	cmol(+)/Kg	0.9	0.69	0.65	0.29	0.84	0.84	0.65	0.6	0.48	0.57	0.35	0.28
CIC	cmol(+)/Kg	24.5	28.5	23.1	25.5	26.5	23.4	24	23.9	23.4	23	20.4	23.7
Calcio (Ca)	cmol(+)/Kg	4.3	4.69	4.58	7.07	4.47	4.49	4.83	4.69	4.54	5.37	4.57	6.2
Magnesio (Mg)	cmol(+)/Kg	4.47	1.4	1.3	1.99	1.36	1.36	1.4	1.38	1.6	1.46	1.81	2.36
Potasio (K)	cmol(+)/Kg	0.74	0.77	0.91	0.79	0.74	0.73	0.93	0.94	0.6	0.56	0.67	0.89
Sodio (Na)	cmol(+)/Kg	0.04	0.05	0.04	0.11	0.04	0.05	0.04	0.05	0.02	0.04	0.02	0.05
B.T	cmol(+)/Kg	9.55	6.91	6.83	9.96	6.61	6.63	7.2	7.06	6.76	7.43	7.07	9.5

C.E: Conductividad eléctrica. S.B: Saturación de bases. CIC: Capacidad de intercambio Catiónico. B.T: Bases totales

El análisis fisicoquímico de los cuatro muestreos realizados a cada una de las parcelas (Fig.4), se presentó de acuerdo a los cambios en los parámetros de más interés, durante un año de estudio. Por tanto, la materia orgánica presenta una tendencia a disminuir después de la adición de biochar en el muestreo 2, con una posible estabilización en un corto periodo de tiempo de 6 semanas en el muestreo 3, para la toma de muestras número 4 ha transcurrido un año y se ha disminuido casi 1/3 de los valores iniciales para cada tratamiento y el control. El comportamiento del carbono orgánico parece similar con tendencia a disminuir bajo las mismas condiciones en los cuatro muestreos.

Frente al pH ácido del suelo, se demuestra que en cortos periodos de tiempo (muestreo 2 y 3) hay un efecto que provoca la disminución de este, transcurrido un año aumenta. Basados en el comportamiento del control de estos tres parámetros, se infiere que hay factores externos al efecto del biochar que podrían alterar el contenido de carbono orgánico, como el pH.

Finalmente, la capacidad de intercambio catiónico (CIC), tiene un comportamiento poco predecible, pero en cuanto al control y la adición de biochar al 3%, después de la adición de biochar hay un aumento marcado en el tratamiento al 3%, seguido de una disminución para ambos al 3 muestreo para luego no presentar cambios al transcurso de un año conservando sus valores. La enmienda al 1% puede notarse un aumento desde la aplicación hasta el 3 muestreo para terminar en el 4 muestreo bajo un valor cercano al control y la aplicación del 3%, la aplicación de biochar al 5% inicialmente disminuye en el 2 muestreo, luego se acerca a las mismas condiciones que el control y la aplicación al 3%, terminando al transcurso de un año por debajo de los otros bioensayos.

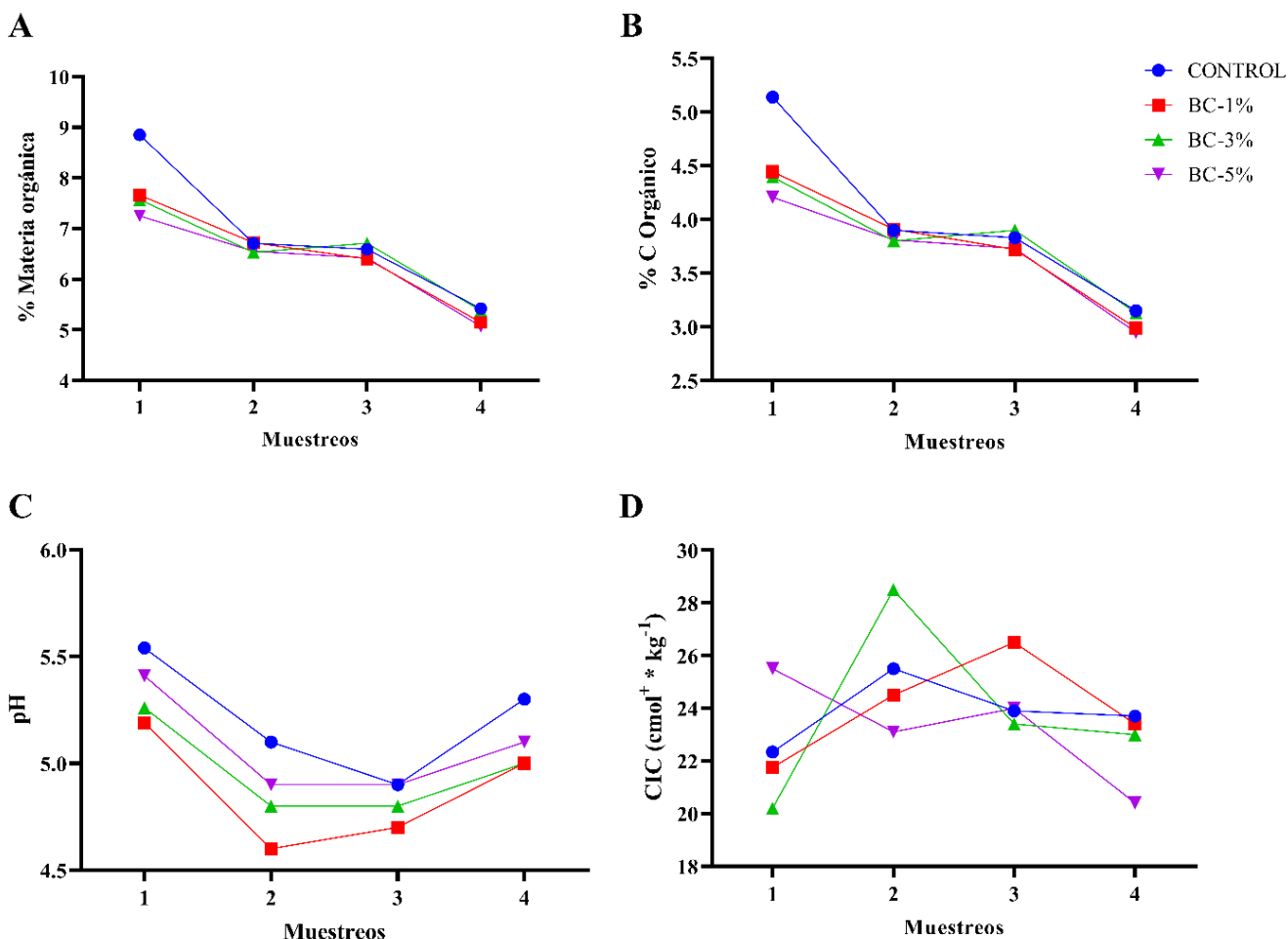


Figura 4. Parámetros fisicoquímicos sensibles al efecto del biochar. A. Porcentaje de materia orgánica. B. Porcentaje de C-orgánico. C. pH. D. CIC Capacidad de intercambio catiónico

De acuerdo con los mismos resultados fisicoquímicos, existe un efecto sobre la disponibilidad de algunos elementos esenciales para el suelo (Fig.5), es el caso del fósforo, se pudo observar que el control no tiene cambios y parece constante en el tiempo con un leve aumento después del transcurso de un año, el tratamiento de biochar al 1% muestra una tendencia a disminuir por debajo del control a cortos plazos hasta el cuarto muestreo donde se presentó una recuperación y aumento, con el mismo comportamiento biochar al 5% tiene una tendencia a disminuir y conservar sus valores cercanos al control hasta aumentar sobre el cuarto muestreo. Caso contrario del potasio en los tratamientos, demuestra que bajan las concentraciones y se mantienen constantes, salvo el control que cambia al tercer muestreo y termina subiendo sobre los bioensayos. Las concentraciones de nitrato (N-NO_3^-) muestran como el control en el tiempo no varía, los tratamientos como biochar al 1% y 5% tienen valores iguales al segundo muestreo siguen con una disminución a corto tiempo y a largo

plazo tiende a aumentar, los resultados del bioensayo al 3% muestran una relación directamente proporcional al tiempo. La disponibilidad de amonio ($N-NH_4^+$) en el suelo de los tratamientos sigue una tendencia inversamente proporcional por una posible transformación a otros compuestos nitrogenados.

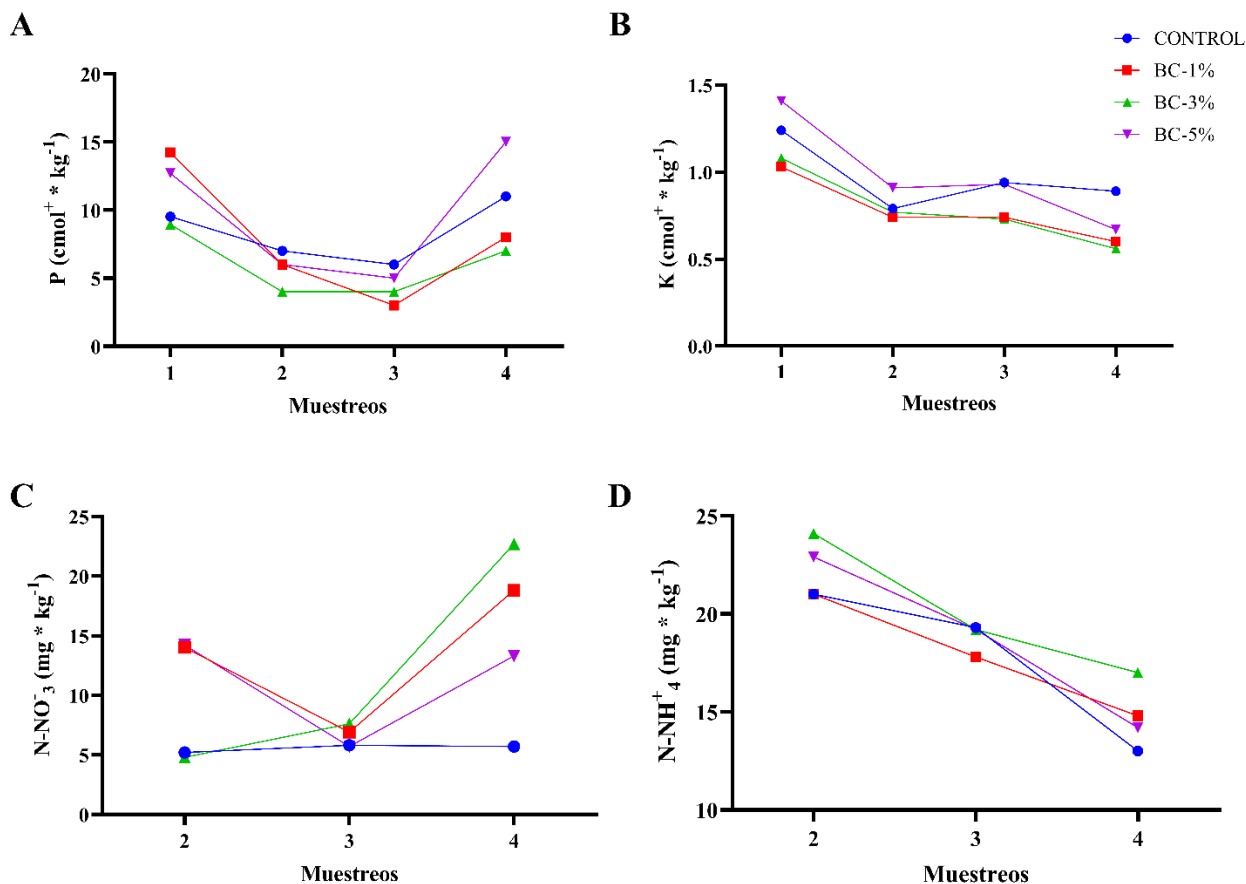


Figura 5. Parámetros fisicoquímicos secundarios al efecto del biochar. A. Fósforo (P) B. Potasio (K) C. $N-NO_3^-$ Nitratos D. $N-NH_4^+$ Amonio

Contenido de carbono orgánico de suelo

Se calculó el carbono almacenado en el suelo para todos los muestreos realizados (Tabla 5); antes de la adición, durante un periodo corto de 6 semanas, 12 semanas y al año, según la guía para la determinación de carbono en pequeñas propiedades rurales, además de la formula se retira la variable de los fragmentos gruesos debido a que no se presentaron en la toma de muestras. Se tomó el porcentaje de carbono orgánico de los resultados provenientes de laboratorio para cada uno de los muestreos (Tabla 2-4). Para la ecuación se deben usar unidades de gC/Kg, se tomó como base de cálculo 1kg de suelo y el porcentaje dado por el laboratorio se dividió en 100 para obtener los gramos de Carbono. La tabla muestra valores importantes de COS (tC/ha), donde es evidente que en la muestra 1, todas las parcelas tienen

mayor cantidad de carbono orgánico con valores entre 0.0643518 a 0.08285025 tC/ha, a partir de la muestra 2 empieza a disminuir hasta la muestra 4, donde se evidencia una pérdida del carbono orgánico del suelo.

$$COS = [COS] * densidad\ aparente * profundidad * (1 - frag) * 10$$

Tabla 5. Contenido de carbono orgánico del suelo

	Tratamiento	[COS] (gC/Kg)	Densidad Aparente (t/m ³)	Profundidad (m)	10 (t C/ha) *	COS (tC/ha)
Muestreo 1	Control	0.05138	1.075	0.15	10	0.08285025
	Parcela 1	0.04446	1.055	0.15	10	0.07035795
	Parcela 2	0.04395	1.01	0.15	10	0.06658425
	Parcela 3	0.04206	1.02	0.15	10	0.0643518
Muestreo 2	Control	0.039	1.075	0.15	10	0.0628875
	Biochar 1%	0.0391	1.055	0.15	10	0.06187575
	Biochar 3%	0.038	1.01	0.15	10	0.05757
	Biochar 5%	0.0381	1.02	0.15	10	0.058293
Muestreo 3	Control	0.0383	1.075	0.15	10	0.06175875
	Biochar 1%	0.0372	1.055	0.15	10	0.058869
	Biochar 3%	0.039	1.01	0.15	10	0.059085
	Biochar 5%	0.0373	1.02	0.15	10	0.057069
Muestreo 4	Control	0.0315	1.075	0.15	10	0.05079375
	Biochar 1%	0.0299	1.055	0.15	10	0.04731675
	Biochar 3%	0.0313	1.01	0.15	10	0.0474195
	Biochar 5%	0.0295	1.02	0.15	10	0.045135

COS: Carbono orgánico del suelo. (*) Multiplicador para unidades en t C/ha

Se procedió a determinar el carbono durante el desarrollo del proyecto, por la diferencia entre la cantidad de carbono en los periodos cortos y largos del bioensayo con biochar (Tabla 6). Estos valores negativos Totales, representan las cantidades de carbono orgánico perdido por hectárea, lo que indica que hay mayor pérdida en el control y en los tratamientos hay menor pérdida. Estos valores se ajustan a las cantidades de enmienda con biochar, es decir a mayor porcentaje de enmienda menor pérdida de carbono orgánico por procesos de sumidero. Este efecto de pérdida se le podría atribuir a la existencia de procesos rápidos de mineralización, que superan la tasa de formación de materia orgánica (Fig. 4-A) a partir del biochar.

$$Diferencia\ de\ Carbono = COS_2 - COS_1$$

Tabla 6. Contenido de carbono orgánico almacenado en los tratamientos

Tratamiento	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Total (tC/ha)
Control	0.08285025	-0.01996275	-0.00112875	-0.010965	-0.0320565
Biochar 1%	0.07035795	-0.0084822	-0.00300675	-0.01155225	-0.0230412
Biochar 3%	0.06658425	-0.00901425	0.001515	-0.0116655	-0.01916475
Biochar 5%	0.0643518	-0.0060588	-0.001224	-0.011934	-0.0192168

Variación de la precipitación

Los periodos de precipitación comprendidos en el año 2019 fueron mucho más marcados en el primer semestre a diferencia del año 2020 (fig.6). Durante el año de esta investigación se evidenciaron precipitaciones intermitentes, que pudieron afectar los tratamientos con enmiendas de biochar, como ya se mostró en las figuras 4 y 5, donde los parámetros fisicoquímicos parecen ser afectados.

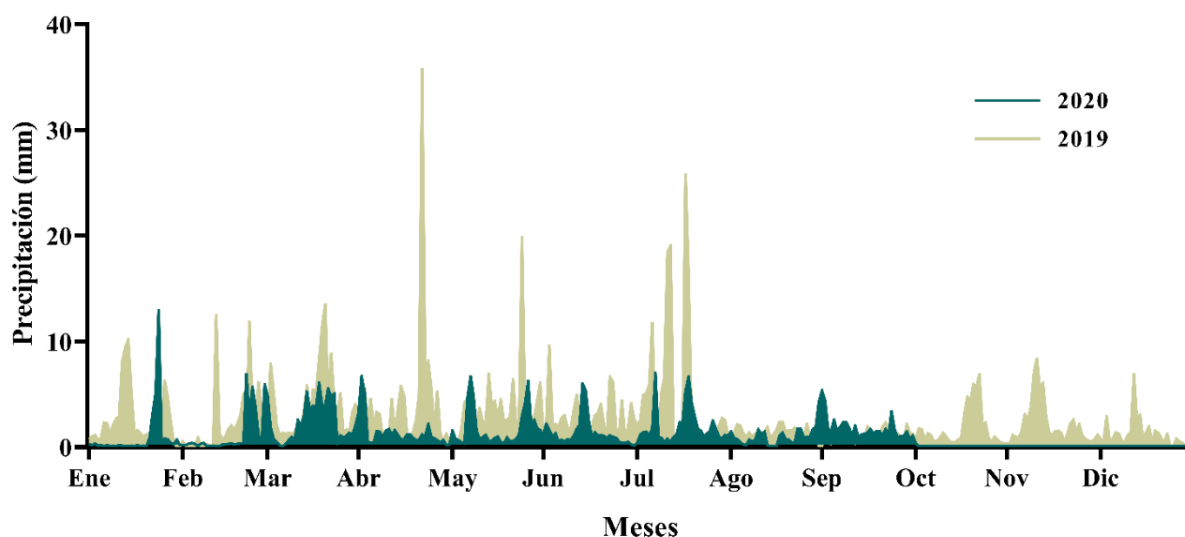


Figura 6. Precipitación por meses en el municipio de Sibaté del periodo 2019 a 2020, Fuente de datos: IDEAM

FASE 3. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

Ensayo de respiración

De acuerdo con los resultados obtenidos de la producción de CO₂ de muestras de suelos (Tabla 7), se puede observar que en la muestra inicial tomada antes de realizar los bioensayos

con biochar, existía una alta respiración lo cual podría indicar actividad metabólica, en comparación con los tratamientos en un periodo de un año con biochar. Se puede apreciar en las muestras finales como la producción de CO₂ ha disminuido, con el control se aprecia que la respiración bajo más de la mitad, así mismo la respiración se ajustó a los porcentajes de adición en los tratamientos, con una leve diferencia donde la adición al 1% está por encima de la adición al 3%.

Tabla 7. Acumulación de CO₂ de la muestra inicial y los tratamientos del muestreo final

MUESTREOS			
Inicial	C-CO ₂ (mg)	Final	C-CO ₂ (mg)
Muestra general	50.38	Control	19.8
		Biochar 1%	27.5
		Biochar 3%	26.4
		Biochar 5%	31.9

Recuento de microorganismos

En la tabla 8 se observa que en la muestra inicial del suelo el recuento total en Cetrimide fue de 37 x10⁶ UFC/mL, el recuento de hongos miceliales en medio PDA fue menor a 10³ UFC/mL. Fue posible evidenciar tres morfotipos de bacterias heterótrofas en un recuento de 34x10⁶ UFC/mL en Agar Nutritivo (Tabla 8). La implementación del medio Caseína-Almidón permitió observar un recuento de 8 x10⁶ UFC/mL de actinobacterias, así mismo la revelación de medio permitió observar sobre dos morfotipos presencia de halo de degradación de almidón. Finalmente, en el medio CMC para organismos celolíticos el recuento fue menor a 10³ UFC/mL.

Tabla 8. Recuentos diferenciales de morfotipos de microorganismos en la muestra inicial de suelo

Medio	Morfotipos	UFC/mL
Agar Nutritivo	AN-1	1 x10 ⁶
	AN-2	9 x10 ⁶
	AN-3	24 x10 ⁶
Carboximetil Celulosa	-	<10 ³
Caseína-Almidón	CA-1*	2 x10 ⁶
	CA-2*	5 x10 ⁶
	CA-3	1 x10 ⁶
Cetrimide	C-1	1 x10 ⁶
	C-2	27 x10 ⁶
	C-3	4 x10 ⁶
	C-4	5 x10 ⁶

UFC/mL: Unidades formadoras de colonia/mL. (*) Presencia de halo

En las muestras tomadas en octubre 2020, los morfotipos encontrados varían entre los tratamientos (Tabla 9). El recuento del control pese a tener una referencia de la muestra inicial presenta un morfotipo relacionado con la degradación de celulosa con un recuento de 3×10^6 UFC/mL que, a diferencia de los tratamientos, el recuento de microorganismos celulolíticos fue menor a 10^3 UFC/mL. Así mismo se puede observar un bajo recuento para los microorganismos en Cetrimide comparado con la muestra inicial. El recuento de hongos miceliales en medio PDA para todos los tratamientos fue menor a 10^3 UFC/mL. Se puede observar que el recuento actinobacterias en medio Caseína-Almidón aumentó con enmiendas de 1 y 3% de biochar y solo se pudo encontrar halo de degradación en un morfotipo de biochar 3% (CA-4) y biochar 5% (CA-1). Se determinó que, en este medio de cultivo, el tratamiento al 5% cuenta con más números de morfotipos, aunque con menor abundancia.

Tabla 9. Recuento de morfotipos de microorganismos en la muestra final de los tratamientos con biochar

Tratamiento	Medio	Morfotipos	UFC/mL
Control	Agar Nutritivo	AN-1	2×10^6
		AN-2	6×10^6
		AN-3	17×10^6
		AN-4	1×10^6
	Carboximetil Celulosa	CMC-3*	3×10^6
	Caseína- Almidón	CA-1	1×10^6
	Cetrimide	C-1	11×10^6
		C-2	28×10^6
Biochar 1%	Agar Nutritivo	AN-1	1×10^6
		AN-2	1×10^6
		AN-3	8×10^6
		AN-4	12×10^6
		AN-5	1×10^6
		AN-6	1×10^6
	Carboximetil Celulosa	-	$<10^3$
	Caseína- Almidón	CA-1	1×10^6
		CA-2	26×10^6
	Cetrimide	C-1	10×10^6
Biochar 3%	Agar Nutritivo	AN-1	1×10^6
		AN-2	2×10^6
		AN-3	107×10^6
	Carboximetil Celulosa	-	$<10^3$
		CA-1	6×10^6

Tratamiento	Medio	Morfotipos	UFC/mL
	Caseína-Almidón	CA-2	28 x10 ⁶
		CA-3	1 x10 ⁶
		CA-4*	1 x10 ⁶
	Cetrimide	C-1	6x10 ⁶
Biochar 5%	Agar Nutritivo	AN-1	1 x10 ⁶
		AN-2	1 x10 ⁶
		AN-3	9 x10 ⁶
		AN-4	4 x10 ⁶
	Carboximetil Celulosa	-	<10 ³
	Caseína-Almidón	CA-1*	3 x10 ⁶
		CA-2	2 x10 ⁶
		CA-3	2 x10 ⁶
		CA-4	4 x10 ⁶
		CA-5	1 x10 ⁶
	Cetrimide	C-1	14 x10 ⁶

UFC/mL: Unidades formadoras de colonia/mL. (*) Presencia de halo

Diversidad de microorganismos

Riqueza y abundancia de morfotipos

En la muestra inicial, se encontró la mayor riqueza de morfotipos en medio Cetrimide, seguido de actinobacterias y bacterias heterótrofas (Fig. 7). En cuanto a los morfotipos considerados de la muestra final, se observa un cambio general de la riqueza de morfotipos, con buenos resultados sobre los morfotipos de bacterias heterótrofas en especial biochar al 1% que registra mayor riqueza, así mismo con actinomicetos aumenta la riqueza proporcional a las mayores adiciones de biochar.

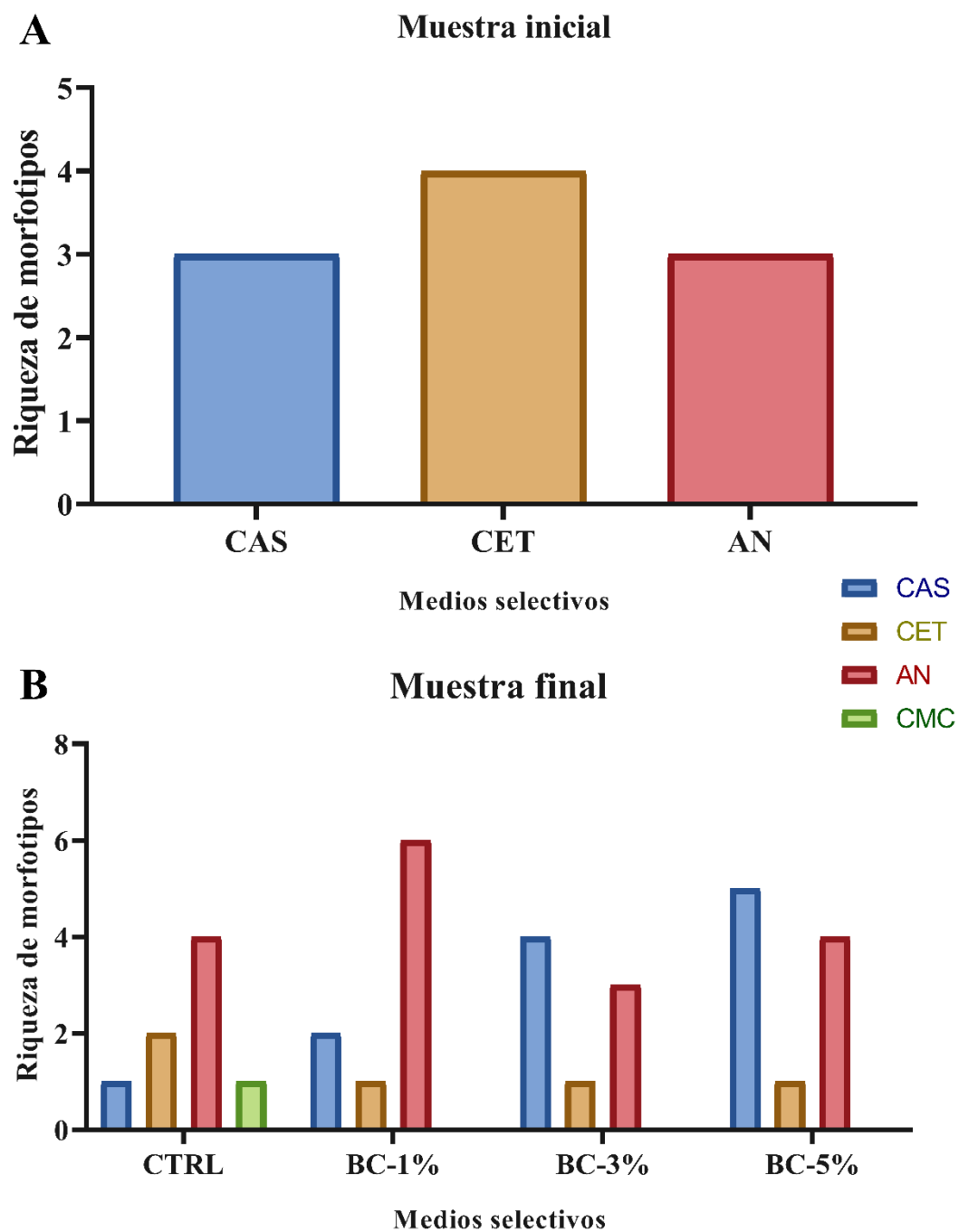


Figura 7. Riqueza de morfotipos presentes en medios de cultivo de las muestras de suelo inicial (A) y los tratamientos de la muestra final (B)

El análisis de abundancias de morfotipos encontrados en Agar Nutritivo (Fig.8), demuestra que los microorganismos heterótrofos del tratamiento de biochar al 3% presentaron la mayor abundancia, pese a tener menos morfotipos, por ejemplo, el morfotipo AN-3 fue el de mayor abundancia con 107×10^6 UFC/mL. El tratamiento de biochar al 1% pese a presentar mayor riqueza de morfotipos cuenta con una baja abundancia, así mismo el tratamiento al 5% muestra la menor abundancia con respecto a las demás, con un registro de 9×10^6 UFC/mL del morfotipo más abundante.

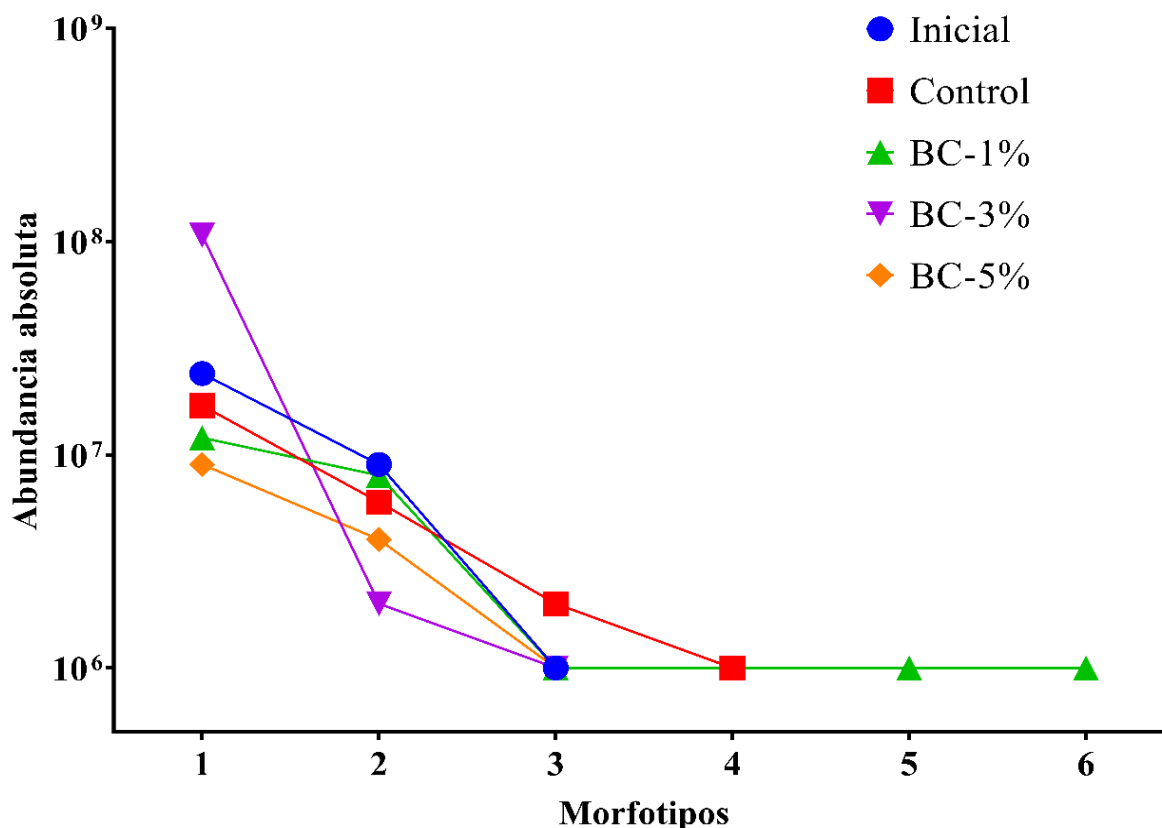


Figura 8. Abundancias de morfotipos presentes en Agar Nutritivo del muestreo inicial y tratamientos de la muestra final

Índices de diversidad alfa

El índice de Simpson (1-D), indica que existe mayor diversidad de morfotipos en el tratamiento de biochar 1%, seguido de biochar 5%, control, muestra inicial y biochar 3%, (Tabla 10). Los índices de dominancia tienen en cuenta las especies mejor representadas sin contar las demás, es así que el índice de dominancia demostró que la comunidad de biochar al 3% tiene un valor superior comparado con los demás, esto indica alta dominancia de un morfotipo sobre los otros microorganismos, por tanto, es un tratamiento con una comunidad de bacterias heterótrofas no homogénea.

Adicionalmente los índices de equidad como Shannon-Wiener en la mayoría de las comunidades, varía entre 0.5 – 5, con valores inferiores a 2 se considera entonces que todos los tratamientos cuentan con una baja diversidad de morfotipos. La equitatividad se acerca a cero cuando una especie domina sobre todas las demás, como en biochar 3% y se acerca a 1 cuando las especies comparten abundancias similares, así como en biochar 1% que tiene 4 de 6 morfotipos con recuentos de 1×10^6 UFC/mL.

Tabla 10. Índices de diversidad para los microorganismos heterótrofos de la muestra inicial y tratamientos de la muestra final

Índice	M. Inicial	Control	Biochar 1%	Biochar 3%	Biochar 5%
Dominancia	0.5692	0.4882	0.3681	0.9466	0.44
Simpson (1-D)	0.4308	0.5118	0.6319	0.05339	0.56
Shannon-Wiener	0.7014	0.9388	1.242	0.1425	1.02
Equitatividad	0.6385	0.6772	0.6934	0.1297	0.7358

DISCUSIÓN

FASE 1. MUESTREO Y ADECUACIÓN DEL SUELO PARA BIOENSAYO EN CAMPO

Instalación y caracterización del sitio de muestreo

La caracterización inicial del suelo, muestra que tiene una textura general franco arenosa (Tabla 2), lo que indica unas proporciones de arcillas, limos y arenas un poco desequilibradas y confiere algunos problemas, como la baja capacidad de retención de agua y suministro de nutrientes, adicional son suelos susceptibles a procesos de compactación en las capas superiores influenciados en periodos de humedad⁶¹. Así mismo se suma que sean suelos con pH ácidos que pueden ser atribuidos a la acumulación de iones de H^+ y Al^+ o la baja disponibilidad de cationes básicos como calcio, magnesio, potasio y sodio por lixiviación¹⁴. Los porcentajes de carbono orgánico y de materia orgánica del suelo son bajos, sumado a los parámetros de pH, CIC y S.A.I es posible que sea poco fértil, así como se mencionó en los métodos, este era un suelo con un manejo anterior y no se sabe con certeza de qué manera y por cuanto tiempo se afectaron algunos parámetros que se ven reflejados en el análisis inicial.

Caracterización y adición de biochar en campo

El análisis fisicoquímico del biochar muestra, alto porcentaje de materia orgánica y carbono orgánico, esto puede deberse a que en el proceso de elaboración se eleva la temperatura y existe un proceso de carbonización del material de residuos de flores. Se ha reportado un incremento del 90% en el contenido de carbono en residuos de madera⁶². Así mismo se

relaciona el incremento del porcentaje de carbono y pH neutros hasta alcalinos, como se muestra en la tabla 3, por el aumento de temperatura, pero se obtiene una mayor pérdida de hidrógeno y nitrógeno^{62,63}. El biochar se puede diferenciar de otras enmiendas orgánicas por la aparición en altas temperaturas (500°C - 1000°C) de estructuras de C-aromáticas fusionadas³⁰, pero dadas las temperaturas de manejo para este residuo alrededor 300-400°C es probable que estas estructuras complejas no se encuentren en gran porcentaje lo que indicaría un rápido aprovechamiento de los microorganismos de esta enmienda orgánica, sin embargo, dependiendo del tipo de biochar una fracción puede lixivarse fácilmente y la otra mineralizarse³⁰.

FASE 2. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO

Evaluación fisicoquímica de la enmienda de biochar en suelo

Los resultados reportados en los tratamientos con biochar en suelo tras un periodo de un año son diferentes a lo que se esperaba, es decir, los primeros efectos se ven reflejados con la rápida disminución de la materia orgánica y carbono orgánico de todos los tratamientos (Tabla 4, Fig.4 A-B), atribuido a cambios en la mineralización de la materia orgánica del suelo inicial y posiblemente al efecto del arado con tractor.

Pero también existieron cambios en los contenidos de materia orgánica y carbono orgánico del control, mediados por factores determinantes no evaluados relacionados con la lixiviación del suelo que también afectan a los tratamientos, como el arado inicial con tractor, este levanta la capa orgánica superficial y deja sin cobertura vegetal el suelo⁶⁴, sumado a la erosión hídrica por periodos de precipitación en el municipio como se muestra en la figura 6. Al iniciar el tratamiento de biochar en octubre 2019 se presentaron dos momentos de precipitación antes de la siguiente toma de muestra en diciembre de 2019, lo cual pudo afectar los valores del análisis por el movimiento de compuestos en el suelo.

Bajo el mismo análisis de precipitación sobre muestra de enero 2020, se evidencia que a partir de la mitad de diciembre hasta finales de enero no hay precipitaciones marcadas, esto estaría relacionado con el casi imperceptible cambio en el muestreo 3 con valores similares para control y los tratamientos. Sobre la muestra final de octubre de 2020, se puede apreciar el mismo efecto inicial, pero este tiene un periodo de 10 meses donde el comportamiento de las lluvias está marcado por precipitaciones intermitentes y posiblemente ocurrió una desaceleración de los procesos de lixiviación (Fig.6), mostrando que la materia orgánica y carbono orgánico no disminuye de forma constante con el paso del tiempo con una enmienda de biochar de residuos de flores, pero que sí tiene factores ambientales asociados a los suelos que afectan sus propiedades.

Frente a estos resultados de la rápida mineralización de la materia orgánica y carbono orgánico (Fig. 4 A-B), existen reportes donde la mineralización del carbono es lenta por la presencia de grupos aromáticos como componente recalcitrante del biochar y le confiere estabilidad al carbono lábil del suelo durante largos periodos de tiempo⁶⁵, lo anterior, se podría relacionar al efecto ocurrido en este estudio, pero debido a las limitaciones de la evaluación a un año, se tendría que reportar en trabajos posteriores a este, para diferenciar los tratamientos del control. Por otro lado, un estudio del biochar de paja de arroz en un año de evaluación, muestra que existen componentes lábiles, como materia volátil, la mezcla de C-alifático, grupos carboxilo y carbohidratos, que sirve como fuente rápida de energía para los procesos que conllevan a mineralizar C, N y micronutrientes en suelo⁶⁶.

En este estudio, pese a que no se determinó la tasa de descomposición del carbono lábil del biochar en suelo, diferentes investigaciones han reportado que el carbono lábil se agota completamente por acción de microorganismos en el transcurso de un año de estudio⁶⁷, como para biochar de bagazo de caña⁶⁵ y tallos de maíz⁶⁸, que relacionan el aumento de temperatura de pirólisis con la disminución del carbono lábil. Así mismo existen biochar de partir de cáscara de maní con paja de trigo⁶⁹ y encina⁷⁰, que muestran un aumento en los contenidos de materia orgánica y carbono orgánico sobre tratamientos con mayor porcentaje de enmienda.

Las adiciones de biochar muestran que las capacidades de intercambio catiónico del suelo aumentan periodos de 6 y 12 semanas sobre enmiendas al 3% y 1% (Fig.4D) respectivamente, esto se apoya en que la disposición de nutrientes aumenta con el transcurso del tiempo y evita que se filtren a través del movimiento del agua^{71,72}, se ha contemplado que la mejora de la CIC está relacionada con la oxidación del carbono aromático y la formación de grupos carboxilo u otros grupos funcionales con una carga neta negativa, por efecto de la reacción superficial de partículas de carbono y adsorción de materia orgánica altamente oxidada o extractos de ácido húmico sobre las superficies porosas del biochar^{18,30}. Se ha reportado que el envejecimiento progresivo del biochar aumenta la superficie de este y los grupos funcionales como carboxilo, fenólico y carbonilo se enriquecen, los grupos piridina y piridona se transforman y otros grupos oxonio se reducen⁷³, no siempre se espera que el envejecimiento ocurra a cortos plazos porque la oxidación del biochar es lenta en ecosistemas naturales, un ejemplo es la aplicación de biochar sobre suelos ácidos con textura arenosa y bajos contenidos de carbono ocurrirá un efecto insignificante⁷³.

La formación de grupos carboxilo mediados por la oxidación de carbono es el mecanismo asociado a la disminución del pH en suelo, en comparación con el aumento del pH relacionado con la disolución de minerales alcalinos, pero estos efectos dependerán en gran medida del pH preexistente en el suelo, la dirección y la magnitud de cambio⁶⁵. Como se muestra en los resultados Figura 4-C, se evidencia en las adiciones la disminución del pH entre los muestreos 1 y 3, pero sobre el muestreo 4 se evidencia un aumento, algunas

investigaciones basadas en la adición de biochar fresco y envejecido, sugieren que la oxidación del biochar seguida de la mejora de la acidez superficial impulsa la disminución del pH⁷⁴, pero no se tiene claro cuáles han sido los factores asociados al control que sufre el mismo comportamiento de los tratamientos con las adiciones de biochar en lugar de mostrar ligeros cambios con el tiempo.

Existen reportes como el meta-análisis de Xiang *et al.* de que los cambios del pH afectan la respuesta de la concentración de fósforo en la raíz de las plantas y su longitud por la aplicación de biochar⁷⁵, puesto que la disponibilidad del fósforo en suelo depende fuertemente del valor del pH, con valores alcalinos superiores a 7.5 los iones fosfato reaccionan rápidamente con calcio y magnesio, a diferencia de pH ácidos reaccionan con aluminio y hierro, donde ambos procesos forman compuestos menos solubles^{76,77}.

Lo anterior tendría relación a lo que ocurrió en este estudio, hay una fuerte relación del pH con el contenido de P en el suelo (Fig.4-C y Fig.5-A). Se puede observar en esta relación que, si hay un cambio mediado por la acción de biochar a corto plazo, pero tiene mayor efecto sobre la enmienda al 1% porque baja su pH a 4.6 más que los otros tratamientos. De la misma manera el efecto de biochar al 5% sobre esta relación es menor, lo que podría indicar que a mayores cantidades de biochar hay posibilidad de reducir efectos sobre el pH y por tanto en la disponibilidad de P. Esto se soporta bajo estudios de evolución de biochar de cascara de café en suelos, donde establecieron que existe liberación de P a partir del biochar y menos lixiviación porque el biochar se mantiene firme en la superficie de la fase sólida del suelo⁷⁸.

Otro compuesto importante en el suelo es el potasio (K), el cual su disponibilidad disminuye después de la aplicación de biochar y sobre el control (Fig.5-B), estos rápidos cambios iniciales se los ha tratado de relacionar con el arado con tractor inicial⁶⁴, pero ante la dificultad de comprobar su efecto en este estudio solo se tiene como una posible causa. Por consiguiente, los efectos del biochar en suelo, muestran que las adiciones de esta enmienda, no crea condiciones favorables para la disponibilidad de K en suelo, siguiendo un comportamiento donde hay una fase de disminución, estabilización y para periodos entre enero 2020 y octubre 2020, los valores para los tratamientos disminuyen con pocas diferencias. Lo anterior tiene un efecto adverso, en comparación con estudios que evalúan el efecto de biochar de encinas en cultivos de lechuga y fresa⁷⁰, donde evidenciaron un aumento significativo de K cuando no se agregó fertilizante ni cal y especialmente sobre fresas esta disponibilidad podría aumentar la resistencia a patógenos.

En este estudio, la influencia del biochar sobre compuestos del ciclo del N se ve reflejado en los valores de nitrato y amonio (Fig. 5 C-D). Pese a que no se evaluaron las cantidades iniciales por limitaciones del análisis de suelos, es importante manejar los datos contenidos para los tratamientos de biochar, por la relación que tienen estos parámetros en suelo. De esta manera los valores del amonio (N-NH_4^+) en suelo disminuyen para los tratamientos y el control, producto de pérdidas en procesos de lixiviación relacionados a periodos de lluvia

sobre el muestreo 2 y 3 (Fig.6), y para el muestreo final un periodo más largo de precipitaciones, que afectaron más al control en comparación con los tratamientos.

Existe una incertidumbre frente a estos resultados puesto que no se sabe con qué cantidad el biochar contribuyo en la disponibilidad del amonio (NH_4^+) en suelo y si hay diferencias entre los tratamientos con el control antes de la aplicación, pero se puede analizar el cambio entre el 2 y 12 mes. Puesto que en la literatura se menciona que las formas de nitrógeno en el biochar son afectadas por la temperatura de producción, siendo así, el biochar producido en altas temperaturas ($>600^\circ\text{C}$) es posible encontrar más NO_3^- mientras que el biochar producido a baja temperatura tienen más NH_4^+ ⁷⁹.

La tendencia a disminuir la disponibilidad de amonio en tratamientos con biochar, también podría deberse a la acción de grupos funcionales carboxílico, hidroxilo, grupos menos ácidos que incluyen fenoles y carbonilos, que se forman en la superficie del biochar con el tiempo, lo que aumenta la CIC del biochar y el potencial de adsorber NH_4^+ por atracción electrostática debido a su carga negativa^{80,81}. Aun así, se discute sobre la carga negativa superficial, debido a que no podría retener nitratos, pero resultados del biochar sometidos a compostaje muestran captura y sorción NO_3^- por mecanismos que aún no se entienden⁷¹.

La adición de biochar en suelos agrícolas aireados, humedad y temperatura moderados crean condiciones para estimular los procesos nitrificantes, es decir el amonio (NH_4^+) sufre oxidación y nitrificación a NO_3^- ^{79,80,82}. Basado en los resultados de nitratos (N-NO_3^-) del suelo, se puede apreciar que en los tratamientos hay procesos de nitrificación entre 2 y 12 mes después de la adición de biochar, sobre el tratamiento al 3% se aprecia que en periodos cortos de 6-12 semanas no hay cambios significativos comparado con el control, pero incrementa con el paso del tiempo a mejores valores que los otros tratamientos. Algunos autores también asocian este proceso a la mejora de las reacciones redox del suelo a través de interacciones con las superficies y dentro de los poros del biochar causando mayor eficiencia en la oxidación de NH_4^+ mediada por microorganismos⁸⁰. Los valores del contenido de nitrato en las muestras del control demuestran que permanece constante en el tiempo ya sea por la ausencia de procesos de nitrificación, materia prima o microorganismos que los active.

Contenido de carbono orgánico del suelo

Se puede observar en la tabla 5 como el contenido de carbono orgánico (COS tC/ha) disminuye en el tiempo y se ve reflejado con valores negativos del almacenamiento de carbono orgánico en suelo en los tratamientos y control presentes en la tabla 6, refiere adicional que no hay procesos de captura o transformación del carbono atmosférico. La pérdida de carbono también se ve como está muy ligada al contenido inicial, teniendo como referente el control que posee mayor cantidad que los tratamientos y estos valores se ajustan premeditadamente pese a que no había dado inicio a los tratamientos con biochar. Por lo

tanto, afectando de manera considerable una evaluación uniforme y esto se ve reflejado sobre el Total (tC/ha) del contenido de carbono orgánico almacenado. Este comportamiento algunos autores lo relacionan al proceso de rápida mineralización del material C-lábil del biochar en cortos periodos de tiempo²⁸, sobre el control existiría un efecto de lixiviación que movilizó el carbono orgánico y al no tener una capa vegetal que contribuyera a evitar este efecto.

Se reporta en este estudio hay cerca de un 24% de pérdida de carbono del control en 6 semanas (Tabla 6 – Muestreo 2), en comparación de los tratamientos biochar 1, 3 y 5%, tienen una pérdida del 12, 13 y 9% respectivamente. Al transcurso de un año de dar inicio, la pérdida acumulativa de carbono es del 38% para control, 32% BC-1%, 28% BC-3% y 29% BC-5%. Estos resultados son apoyados por autores que sugieren un aumento en la respuesta de la biomasa microbiana después de la aplicación de biochar en suelos agrícolas y estaría explicado por la disponibilidad de una fracción no aromática del biochar fácilmente descomponible²⁸.

FASE 3. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

Ensayo de respiración

Basados en los resultados de la acumulación de CO₂ (tabla 7), se puede inferir que sobre el suelo había procesos que permitía a la comunidad de microorganismos tener valores más altos de respiración, pero este resultado podría estar sesgado por la influencia del arado con tractor inicial y no permitió evidenciar la respiración en el cual era su estado normal. Siguiendo con los resultados de la muestra final después de un año de tratamiento con enmiendas de biochar, es posible ver un ajuste de la respiración a los porcentajes de los tratamientos.

Esta evolución del CO₂ en suelos por enmiendas de biochar, en revisiones de estudios, se asocia a la pirolisis incompleta de la biomasa a baja temperatura y produce biochar más vulnerables a la degradación, porque existen microorganismos que aceleran la descomposición de las fracciones lábiles de carbono del biochar¹⁶, pese a que no se evaluó los cambios tempranos sobre el suelo por limitaciones metodológicas se puede inferir que hubo mineralización rápida del biochar después de la aplicación, por tanto, también existe la posibilidad de encontrar más disponibilidad de compuestos de fácil degradación por área de aplicación de las enmiendas (1%,3%,5%) respectivamente, que se ven reflejados en los valores de la acumulación de C-CO₂.

Las teorías que involucran la evolución inicial de CO₂ son variadas, algunos autores reportan que la baja respiración se puede deber a la adsorción del COS por el biochar y previene que microorganismos y enzimas extracelulares tengan acceso al COS^{83,84} y otros contemplan la

posibilidad de que factores abióticos influyen en la oxidación del biochar en la superficie de este sin la mediación con microorganismos⁸⁵.

Diversidad de microorganismos

Riqueza y abundancia

La riqueza y abundancia de microorganismos en este estudio muestra que existen algunas diferencias con la presencia de grupos importantes de microorganismos que están involucrados en actividades funcionales del suelo, se ha reportado que el biochar induce cambios en las propiedades microbianas del suelo, como biomasa microbiana, composición y diversidad de las comunidades, grupos funcionales específicos y procesos bioquímicos, aclarando que existe un complejo de variables y relaciones fisicoquímicas del suelo y del biochar que producen estos cambios¹⁶.

Los análisis de riqueza de morfotipos indican que es posible encontrar grupos de actinobacterias, microorganismos heterótrofos y posibles *Pseudomonas* spp. Teniendo en cuenta las variables fisicoquímicas tomadas y su análisis es posible que algunos procesos alteraron la comunidad inicial de microorganismos en el transcurso de un año y estos adquirieron asociaciones con el biochar en suelos para activar sus procesos metabólicos.

El medio Cetrimide caracterizado por ser un medio selectivo de *Pseudomonas* spp., podría indicar que, en la riqueza de microorganismos inicial, existían procesos de degradación por ser microorganismos quimio-heterótrofos. Son organismos que están involucrados en la desnitrificación en ausencia de oxígeno, porque el oxígeno es sustituido por nitrato como una alternativa al terminal aceptor de electrones durante un proceso de respiración anaerobia y es reducido a N_2O o N_2 ⁸⁶. Lo anterior mostraría un efecto diverso en este estudio, en la muestra control hay dos morfotipos con más recuentos que la muestra inicial, pero en este suelo la cantidad de nitratos fue constante durante el año de evaluación (Fig.5-C). En comparación con los tratamientos, en donde a las 12 semanas (3 muestreo), hay una disminución de nitratos en las enmiendas 1 y 5%, que podrían estar influenciados por procesos de desnitrificación. Sobre la enmienda al 3%, hay dos posibilidades contempladas, de que el biochar no aportó la cantidad de nitratos en igual proporción o se agotó rápidamente en 6 semanas (2 muestreo).

Un estudio evaluó el biochar de paja de arroz por pirolisis lenta en un suelo franco-arenoso, y observaron una sucesión en la comunidad microbiana con la enmienda de biochar, donde los géneros dominantes pasaron de *Pseudomonas* spp. (*Proteobacteria*) en una incubación de 33 días a *Arthrobacter* (*Actinobacterias*) en la incubación a 200 días, además discuten la competencia sucesiva que tienen las comunidades microbianas entre la estrategia-R (usando fracciones C-lábiles) y estrategia-K (recuperación de actividad tardía) para producir cambios en la mineralización del carbono orgánico nativo del suelo⁸⁷. Esto se vería reflejado en la riqueza de morfotipos de la muestra final, donde es posible afirmar (figura 7) que la riqueza

de actinobacterias aumento en relación a las enmiendas con mayor adición de biochar, pero con menor abundancia en biochar al 5%, frente a la riqueza de morfotipos de *Pseudomonas* spp.

Adicionalmente *Pseudomonas* spp. tiene rangos tolerantes de pH para sus poblaciones, aunque se pueden adaptar fácilmente a condiciones extremas, sus procesos a pH muy ácidos o alcalinos se ralentizan⁸⁸, esto tendría relación con los datos de disminución del pH en periodos cortos (12 semanas) con enmiendas de biochar, que afectó directamente a la comunidad de *Pseudomonas* spp. y dio la sucesión a otros microorganismos. La enmienda de biochar también pudo presentar una afinidad inicial con este grupo al tener un pH de 7.40 cercano a la neutralidad (tabla 3) y con los cambios fisicoquímicos pudo perder esta relación por la disminución del pH en los tratamientos más que el control. De igual manera la variación del pH también afecta la solubilización, la sorción de contaminantes por metales pesados y iones, como las formas catiónicas más solubles a pH ácido (NH_4^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+) que las formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Cl^-) más solubles en pH alcalino⁸⁸ y se afectarían los procesos de respiración anaerobia de este grupo de organismos.

Por otro lado, las actinobacterias que crecen en medio Caseína-Almidón, la riqueza de estos organismos es ajustado a las enmiendas, teniendo así para biochar 5% mayor cantidad de morfotipos y sobre el control la menor cantidad. Son microorganismos característicos de suelos que tienen una alta actividad biológica y son abundantes en tratamientos con biochar^{57,87,89}. Lo anterior solo explicaría la abundancia en las enmiendas de 1 y 3% después de un año de tratamiento.

La relación que tienen las actinobacterias con el biochar es por la descomposición de compuestos aromáticos del suelo y hay una ventaja de estos organismos porque degradan materiales semi-recalcitrantes, como madera y lignina⁹⁰. Esto se ajustaría al análisis fisicoquímico de la pérdida de materia orgánica y carbono orgánico en este estudio, que efecto a todas las parcelas por igual, pero había biochar como fuente de C-aromático. Esto podría indicar que las enmiendas de biochar, en periodos de 12 semanas cuentan con materiales lábiles y son utilizados rápidamente por otros organismos, al momento de agotarse como fuente de energía quedan materiales más complejos para la degradación y la comunidad de microorganismos sería reemplazada para dar lugar a la descomposición por actinobacterias, esto también podría apoyarse en los resultados de la composición de las enmiendas de biochar.

Finalmente, los microorganismos heterótrofos que crecen en Agar Nutritivo, presentaron menor riqueza y mayor abundancia para la enmienda 3%, así mismo, los recuentos de la enmienda al 1% mostraron mayor riqueza de morfotipos y no fueron más abundantes que la muestra inicial y control (Fig.8). Estos microorganismos se caracterizan si requieren uno o más compuestos orgánicos como fuente de carbono, por tanto, pueden abarcar muchos grupos de organismos que podrían estar compartidos con los otros medios de cultivo que

fueron seleccionados para este estudio. En la literatura se describe que la respiración heterótrofa surge de la descomposición de materia orgánica, raíces muertas, desechos de fauna y microbios del suelo⁹¹, bajo esto existen reportes que las adiciones de biochar de paja de trigo⁹¹ y hojas de bambú⁸³, en suelo de plantaciones de bambú, reduce la respiración heterótrofa con un año de tratamiento, que se ve indicado por el bajo flujo de CO₂ y acumulación de CO₂ en el suelo, además se le atribuye este efecto a la adsorción de enzimas del suelo, por tanto reduce la actividad del ciclo del carbono y otra causa sería el aumento de la estabilidad química del COS, promoviendo la formación de agregados del suelo, disminuyendo la respiración heterótrofa del suelo. Para este estudio, el biochar de residuos de flores mostraría el mismo efecto, demostrado por la disminución de CO₂ en el ensayo de respiración y el contenido de carbono orgánico del suelo, pero no sobre la riqueza y abundancia de microorganismos heterótrofos.

Por otro lado, un estudio demostró que la adición de biochar a partir de estiércol, cambia la respiración heterótrofa en 7 días de incubación, pero son efectos basados en la nitrificación, debido a que el biochar puede adsorber iones de NH₄⁺ en su superficie, limitando las actividades nitrificantes por microorganismos⁹². Esto tendría relación con los resultados de este estudio, de cómo la disponibilidad de Amonio (NH₄⁺) desciende con el tiempo y se vería reflejado en la reducción de nitratos (NO₃⁻) presentes en el suelo a las 12 semanas de la adición de biochar. Pero igualmente un estudio afirma que la producción de biochar a partir del tallo de totora entre 300-500°C, reducen la riqueza y diversidad de la comunidad de microorganismos, además promueven procesos de desnitrificación heterótrofa a las 36 horas de tratamiento⁹³. En periodos prolongados, existen reportes de 28 días de incubación que indican que es poca la diferencia de la abundancia entre los tratamientos y el control, pero aun así es posible evidenciar nuevas especies con bajas abundancias⁸⁹, este análisis podría servir para explicar lo ocurrido en las abundancias de este estudio.

Índices de diversidad alfa

La diversidad en general está marcada por morfotipos pocos dominantes en cada unidad de muestreo, con la excepción de la enmienda al 3% que demostró ser una comunidad no homogénea. Pero existen muchos factores asociados al suelo, como la disponibilidad de recursos, cambios en parámetros fisicoquímicos o hábitat diferentes, son discutidos como causantes de que algunos grupos microbianos se vuelva competitivamente dominantes³⁰. Pero para un medio tan general como el Agar Nutritivo ofrece limitantes al momento de ser más específicos en los grupos de organismos dominantes relacionados a la enmienda al 3%, solo hay un acercamiento a que estén relacionados al ciclo del N, basado en los resultados de Amonio (NH₄⁺) y Nitrato (NO₃⁻) después de un año de evaluación.

La diversidad de Shannon-Wiener paso de 0.7 y 0.93, de muestra inicial y control respectivamente, a valores de 1.2 de biochar al 1%, 0.14 de biochar 3% y 1.0 de biochar 5%, destacando así que ningún tratamiento entra en el rango de media-alta diversidad con este

índice, así mismo se tiene que la adición al 3% tiene el menor valor de diversidad de todos los tratamientos. Frente al índice de Simpson, cambia un poco la perspectiva anterior, teniendo mayor diversidad en biochar al 1% y menor con la muestra inicial.

Basado en la revisión de artículos, es posible observar que estudios relacionados a las enmiendas de biochar reportan la diversidad desde los índices de Simpson y Shannon-Wiener, de esta manera, la diversidad de Shannon aumenta con las adiciones de biochar después de tres meses de tratamiento⁶⁹, 5 meses después⁹⁴ o no presentar cambios en la diversidad general en 15 días de incubación⁹⁵. Por lo ocurrido en este estudio, se tendría que revisar el nivel de sensibilidad de la metodología empleada para calcular la diversidad por el efecto de biochar de residuos de flores sobre el suelo.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio abrieron un camino de investigación para la comprensión de los efectos de las enmiendas de biochar y todo el componente de variables que afectan al suelo y sus microorganismos. A largo plazo esto permitirá el desarrollo de mejores estrategias para las enmiendas basadas en biochar y la recuperación de suelos degradados. A partir de los objetivos planteados, se puede concluir que:

- Los análisis fisicoquímicos de la enmienda de biochar son importantes para poder establecer los posibles efectos antes de la adición al suelo.
- Las adiciones de biochar en suelo tienen un efecto variado en las características fisicoquímicas, no se diferencian sus efectos entre los tratamientos y del control, en los parámetros de carbono orgánico y materia orgánica, solo en función de nitratos, pH, CIC y P hay cambios evidentes que podrían ser objeto de estudio en conjunto. Adicional la precipitación fue una variable determinante para brindar un mejor entendimiento de los ensayos de enmiendas en campo.
- Los índices de diversidad alfa de microorganismos heterótrofos, expresan en general baja diversidad de morfotipos en todas las unidades comparadas, sin embargo, es posible observar dominancia de un organismo en la comunidad de la enmienda al 3%, adicional, basado en los resultados de riqueza de morfotipos del grupo de actinobacterias, hay una preferencia por adiciones de mayor enmienda de biochar.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios más detallados en campo, de los efectos del biochar de residuos de flores en suelos, basados en la mineralización de C y N, enzimas del suelo y técnicas moleculares para ver un panorama más completo y preciso de efecto de las adiciones de biochar en suelos colombianos.

BIBLIOGRAFÍA

Se utilizo el formato para referencias de la revista Nature para artículos científicos.

1. Lal, R. Tillage effects on soil degradation, soil resilience, soil quality and sustainability.pdf. *Soil Tillage Res.* **27**, 1–8 (1993).
2. Lal, R. Degradation and resilience of soils. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **352**, 997–1010 (1997).
3. IDEAM, MADS & U.D.C.A. *Estudio nacional de la degradación de suelos por erosión en Colombia.* (2015).
4. Carballas, T. Microbiología y bioquímica del suelo. *Recursos Rurais* vol. 1 5–8 (2004).
5. IDEAM, CAR & U.D.C.A. *Protocolo para la identificación y evaluación de la degradación de suelos por salinización.* (2017).
6. López, R. *DEGRADACIÓN DEL SUELO: CAUSAS, PROCESOS, EVALUACIÓN E INVESTIGACIÓN.* Centro interamericano de desarrollo e investigación ambiental y territorial universidad de los Andes (2002).
7. Lamb, D., Erskine, P. D. & Parrotta, J. A. Restoration of degraded tropical forest landscapes. *Science (80-.)*. **310**, 1628–1632 (2005).
8. National Research Programme NRP, Federal Office for the Environment (FOEN), Agriculture Federal (FOAG), Federal Office for Spatial & Development. *Soil: A precious natural resource.* <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/soil/publications-studies/publications/soil-a-precious-natural-resource.html> (2009).
9. Scherr, S. J. The future food security and economic consequences of soil degradation in the developing world. in *RESPONSE TO LAND DEGRADATION* (eds. Bridges, E. M. et al.) vol. 100 16 (2003).
10. Guerra, A. *et al.* Environment management and health risks of soil erosion gullies in São Luís (Brazil) and their potential remediation using palm-leaf geotextiles. *Environ. Heal. Risk III* **9**, 459–467 (2005).
11. Lal, R. Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. *Food Secur.* **1**, 45–57 (2009).
12. Macías, F. Recuperación de suelos degradados, reutilización de residuos y secuestro de carbono. Una alternativa integral de mejora de la calidad ambiental. *Recursos Rurais* vol. 1 49–56 (2004).
13. Beare, M. ., Vikram, M., Tian, G. & Srivastava, S. . Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: The role of decomposer biota. *Appl. Soil Ecol.* **6**, 17–35 (1997).
14. FAO & GTIS. *ESTADO MUNDIAL DEL RECURSO DEL SUELO - RESUMEN TÉCNICO.* *Fao* (2016).
15. Arias, M. E., González-Pérez, J. A., González-Vila, F. J. & Ball, A. S. Soil health - A new challenge for microbiologists and chemists. *Int. Microbiol.* **8**, 13–21 (2005).
16. Palansooriya, K. N. *et al.* Response of microbial communities to biochar-amended soils: a critical review. *Biochar* **1**, 3–22 (2019).
17. Ok, Y. S., Chang, S. X., Gao, B. & Chung, H. J. Smart biochar technology-A shifting paradigm towards advanced materials and healthcare research. *Environ. Technol. Innov.* **4**, 206–209 (2015).

18. Qian, K., Kumar, A., Zhang, H., Bellmer, D. & Huhnke, R. Recent advances in utilization of biochar. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **42**, 1055–1064 (2015).
19. Berge, N., Kammann, C., Ro, K. & Libra, J. Environmental Applications of HTC Technology: Biochar Production, Carbon Sequestration, and Waste Conversion. in *SUSTAINABLE CARBON MATERIALS FROM HYDROTHERMAL PROCESSES* (ed. TITIRICI, M.) 1–49 (2013).
20. Fang, J., Zhan, L., Ok, Y. S. & Gao, B. Minireview of potential applications of hydrochar derived from hydrothermal carbonization of biomass. *J. Ind. Eng. Chem.* **57**, 15–21 (2018).
21. Sáez, A. & Urdaneta, J. Manejo de residuos solidos en America Latina y el Caribe. *Omnia* **20**, 121–135 (2014).
22. Hoornweg, D. & Bhada-Tata, P. *WHAT A WASTE - A GLOBAL REVIEW OF SOLID WASTE MANAGEMENT*. (2012).
23. Zhang, M. & Ok, Y. S. Biochar soil amendment for sustainable agriculture with carbon and contaminant sequestration. *Carbon Manag.* **5**, 255–257 (2014).
24. Escalante, A. *et al.* Biocarbón (biochar) I: Naturaleza, historia, fabricación y uso en el suelo Biocarbon (biochar) I: Nature, history, manufacture and use in soil. *Terra Latinoam.* **34**, 367–382 (2016).
25. Huang, H. & Tang, L. Treatment of organic waste using thermal plasma pyrolysis technology. *Energy Convers. Manag.* **48**, 1331–1337 (2007).
26. Bridgwater, A. V., Meier, D. & Radlein, D. An overview of fast pyrolysis of biomass. *Org. Geochem.* **30**, 1479–1493 (1999).
27. Joseph, S. D. *et al.* An investigation into the reactions of biochar in soil. *Aust. J. Soil Res.* **48**, 501–515 (2010).
28. Bruun, E. W., Ambus, P., Egsgaard, H. & Hauggaard-Nielsen, H. Effects of slow and fast pyrolysis biochar on soil C and N turnover dynamics. *Soil Biol. Biochem.* **46**, 73–79 (2012).
29. Gul, S., Whalen, J. K., Thomas, B. W., Sachdeva, V. & Deng, H. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions. *Agric. Ecosyst. Environ.* **206**, 46–59 (2015).
30. Lehmann, J. *et al.* Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 1812–1836 (2011).
31. Li, X., Wang, T., Chang, S. X., Jiang, X. & Song, Y. Biochar increases soil microbial biomass but has variable effects on microbial diversity: A meta-analysis. *Sci. Total Environ.* **749**, 141593 (2020).
32. Zhou, H. *et al.* Changes in microbial biomass and the metabolic quotient with biochar addition to agricultural soils: A Meta-analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.* **239**, 80–89 (2017).
33. Zhu, X., Chen, B., Zhu, L. & Xing, B. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. *Environ. Pollut.* **227**, 98–115 (2017).
34. Xu, M. *et al.* Shifts in the relative abundance of bacteria after wine-lees-derived biochar intervention in multi metal-contaminated paddy soil. *Sci. Total Environ.* **599–600**, 1297–1307 (2017).
35. Albiach, M. . *et al.* Sobre las enzimas del suelo y sus técnicas de medida. *Edafología* **13**, 117–125 (2006).
36. Martínez, M. M. *et al.* Técnicas para el análisis de actividad enzimática en suelos. in

MÉTODOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA LA EVALUACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS (eds. Cuevas, M., Espinosa, G., Ilizaliturri, C. & Mendoza, A.) 19–46 (2012).

37. Schloter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. J. & Elsas, J. D. Van. Microbial indicators for soil quality. *Biol. Fertil. Soils* 1–10 (2018) doi:doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3.
38. Nannipieri, P. *et al.* Soil enzymology: Classical and molecular approaches. *Biol. Fertil. Soils* **48**, 743–762 (2012).
39. Encarnación, L. Estrategias para la recuperación de suelos degradados en ambientes semiáridos: Adición de dosis elevadas de residuos orgánicos de origen urbano y su implicación en la fijación de Carbono. (UNIVERSIDAD DE MURCIA, 2013).
40. Rillig, M. C. & Mummey, D. L. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* **171**, 41–53 (2006).
41. Chen, G., Zhu, H. & Zhang, Y. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Res. Microbiol.* **154**, 393–398 (2003).
42. Zimmerman, A. R., Gao, B. & Ahn, M. Y. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 1169–1179 (2011).
43. Murphy, D. V., DeLuca, T. H., Rousk, J., Edwards-Jones, G. & Jones, D. L. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. *Soil Biol. Biochem.* **45**, 113–124 (2011).
44. Noyce, G. L., Basiliko, N., Fulthorpe, R., Sackett, T. E. & Thomas, S. C. Soil microbial responses over 2 years following biochar addition to a north temperate forest. *Biol. Fertil. Soils* **51**, 649–659 (2015).
45. Alcaldía Municipal de Sibaté-Cundinamarca. *Plan de Desarrollo Sibaté Cundinamarca*.
46. Jaller R, S. *Análisis de los sistemas de producción agrícola de las Provincias de Soacha y Sumapaz (Cundinamarca)*. *Fao* (2010).
47. Avella R, V. Plan de manejo ambiental para la planta de tratamiento de residuos sólidos, del municipio de sibaté Cundinamarca. (Universida Libre, 2004).
48. Martinez, L. & Vargas, Y. Evaluación de la contaminación en el suelo por plomo y cromo y planteamiento de alternativa de remediación en la represa del Muña municipio de Sibaté-Cundinamarca. (Universidad de la Salle, 2017).
49. CAR, C. A. R. de C. *Plan de manejo ambiental municipal, cuenca media del río Bogotá: subregión Central*. vol. 1 (2018).
50. IGAC. Guía de muestreo. 8 (2013).
51. Rüginitz, M., Chacón, M. & Porro, R. *GUÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBONO EN PEQUEÑAS PROPIEDADES RURALES*. (Consórcio Iniciativa Amazônica (IA), 2009).
52. Forero, D. & Navarro, P. Implementación de alternativa de aprovechamiento de residuos sólidos orgánicos mediante el proceso de pirólisis lenta para la obtención de materiales de uso agrícola. (UNIVERSIDAD DE LA SALLE, 2017).
53. Anderson, J. P. E. Soil Respiration. in *METHODS OF SOIL ANALYSIS: PART 2 CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES* vol. 9 831–871 (1983).
54. Isermeyer, H. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkd.* **56**, 26–38 (1952).

55. Durango, W., Uribe, L., Henríquez, C. & Mata, R. Respiración, biomasa microbiana y actividad fosfatasa del suelo en dos agroecosistemas y un bosque en Turrialba, Costa Rica. *Agron. Costarric.* **39**, 37–46 (2015).
56. Guerrero O, P., Quintero L, R., Espinoza H, V., Benedicto V, G. & Sanches C, M. Respiración De Co₂ Como Indicador De La Actividad Microbiana En Abonos Orgánicos De Lupinus. *Terra Latinoam.* **30**, 355–362 (2012).
57. Nates, E. Evaluación del efecto de biochar en el suelo y la calidad de frutos en cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). (PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, 2014).
58. Universidad Nacional de Córdoba. Guía de actividades prácticas - Microbiología agrícola. *Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Córdoba* (2015).
59. Villarreal, H. *et al.* **MANUAL DE MÉTODOS PARA EL DESARROLLO DE INVENTARIOS DE BIODIVERSIDAD.** Programa Inventarios de Biodiversidad; Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (2004).
60. Moreno, C. E. **MÉTODOS PARA MEDIR BIODIVERSIDAD.** M&T - Manuales y Tesis SEA (2002).
61. Vargas, O., Prieto, G., Gonzalez, L. & Matamorros, A. *Geoquímica de Metales pesados en suelos de la cuenca del río Bogotá.* http://recordcenter.sgc.gov.co/B11/23008001024383/Documento/pdf/Geoquimica_Metales_Pesados_cuenca_rio_Bogota.pdf (2004).
62. Weber, K. & Quicker, P. Properties of biochar. *Fuel* **217**, 240–261 (2018).
63. Kim, K. H., Kim, J. Y., Cho, T. S. & Choi, J. W. Influence of pyrolysis temperature on physicochemical properties of biochar obtained from the fast pyrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). *Bioresour. Technol.* **118**, 158–162 (2012).
64. Gómez-Calderón, N., Villagra-Mendoza, K. & Solórzano-Quintana, M. La labranza mecanizada y su impacto en la conservación del suelo (revisión literaria). *Tecnol. en Marcha* **31**, 170 (2018).
65. Cross, A. & Sohi, S. P. The priming potential of biochar products in relation to labile carbon contents and soil organic matter status. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 2127–2134 (2011).
66. Purakayastha, T. J., Kumari, S. & Pathak, H. Characterisation, stability, and microbial effects of four biochars produced from crop residues. *Geoderma* **239–240**, 293–303 (2015).
67. Wang, J., Xiong, Z. & Kuzyakov, Y. Biochar stability in soil: Meta-analysis of decomposition and priming effects. *GCB Bioenergy* **8**, 512–523 (2016).
68. Yao, Q. *et al.* Changes of bacterial community compositions after three years of biochar application in a black soil of northeast China. *Appl. Soil Ecol.* **113**, 11–21 (2017).
69. Wong, J. T. F. *et al.* Effects of biochar on bacterial communities in a newly established landfill cover topsoil. *J. Environ. Manage.* **236**, 667–673 (2019).
70. De Tender, C. A. *et al.* Biological, physicochemical and plant health responses in lettuce and strawberry in soil or peat amended with biochar. *Appl. Soil Ecol.* **107**, 1–12 (2016).
71. Sanchez-Monedero, M. A. *et al.* Role of biochar as an additive in organic waste composting. *Bioresour. Technol.* **247**, 1155–1164 (2018).
72. Zheng, H., Wang, X., Luo, X., Wang, Z. & Xing, B. Biochar-induced negative carbon mineralization priming effects in a coastal wetland soil: Roles of soil aggregation and

- microbial modulation. *Sci. Total Environ.* **610–611**, 951–960 (2018).
73. Domingues, R. R. *et al.* Enhancing cation exchange capacity of weathered soils using biochar: Feedstock, pyrolysis conditions and addition rate. *Agronomy* **10**, 1–17 (2020).
 74. Zhao, R., Coles, N. & Wu, J. Carbon mineralization following additions of fresh and aged biochar to an infertile soil. *Catena* **125**, 183–189 (2015).
 75. Xiang, Y., Deng, Q., Duan, H. & Guo, Y. Effects of biochar application on root traits: a meta-analysis. *GCB Bioenergy* **9**, 1563–1572 (2017).
 76. Jensen, T. . Soil pH and the availability of plant nutrients. *Plant Nutr. Today* **49**, 27,1,183 (2010).
 77. Penn, C. J. & Camberato, J. J. A critical review on soil chemical processes that control how soil pH affects phosphorus availability to plants. *Agric.* **9**, 1–18 (2019).
 78. de Sousa Lima, J. R. *et al.* Effect of biochar on physicochemical properties of a sandy soil and maize growth in a greenhouse experiment. *Geoderma* **319**, 14–23 (2018).
 79. Gul, S. & Whalen, J. K. Biochemical cycling of nitrogen and phosphorus in biochar-amended soils. *Soil Biol. Biochem.* **103**, 1–15 (2016).
 80. Nguyen, T. T. N. *et al.* Effects of biochar on soil available inorganic nitrogen: A review and meta-analysis. *Geoderma* **288**, 79–96 (2017).
 81. Zheng, H., Wang, Z., Deng, X., Herbert, S. & Xing, B. Impacts of adding biochar on nitrogen retention and bioavailability in agricultural soil. *Geoderma* **206**, 32–39 (2013).
 82. Awad, Y. M., Lee, S. S., Kim, K. H., Ok, Y. S. & Kuzyakov, Y. Carbon and nitrogen mineralization and enzyme activities in soil aggregate-size classes: Effects of biochar, oyster shells, and polymers. *Chemosphere* **198**, 40–48 (2018).
 83. Li, Y. *et al.* Biochar reduces soil heterotrophic respiration in a subtropical plantation through increasing soil organic carbon recalcitrancy and decreasing carbon-degrading microbial activity. *Soil Biol. Biochem.* **122**, 173–185 (2018).
 84. Zavalloni, C. *et al.* Microbial mineralization of biochar and wheat straw mixture in soil: A short-term study. *Appl. Soil Ecol.* **50**, 45–51 (2011).
 85. Bruun, S., Jensen, E. S. & Jensen, L. S. Microbial mineralization and assimilation of black carbon: Dependency on degree of thermal alteration. *Org. Geochem.* **39**, 839–845 (2008).
 86. Eldor, P. *SOIL MICROBIOLOGY, ECOLOGY AND BIOCHEMISTRY*. (Elsevier, 2007).
 87. Zhu, X., Mao, L. & Chen, B. Driving forces linking microbial community structure and functions to enhanced carbon stability in biochar-amended soil. *Environ. Int.* **133**, 105211 (2019).
 88. Esmeralda, S. *et al.* Factores bióticos y abióticos que condicionan la bioremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA* **6**, 76–84 (2008).
 89. Zhang, M. *et al.* Investigating the effect of biochar and fertilizer on the composition and function of bacteria in red soil. *Appl. Soil Ecol.* **139**, 107–116 (2019).
 90. Farrell, M. *et al.* Microbial utilisation of biochar-derived carbon. *Sci. Total Environ.* **465**, 288–297 (2013).
 91. Zhang, S. *et al.* Contrasting short-term responses of soil heterotrophic and autotrophic respiration to biochar-based and chemical fertilizers in a subtropical Moso bamboo plantation. *Appl. Soil Ecol.* **157**, 103758 (2021).
 92. Pokharel, P., Qi, L. & Chang, S. X. Manure-based biochar decreases heterotrophic respiration and increases gross nitrification rates in rhizosphere soil. *Soil Biol.*

- Biochem.* **154**, 3–6 (2021).
93. Wu, Z. *et al.* Highly efficient nitrate removal in a heterotrophic denitrification system amended with redox-active biochar: A molecular and electrochemical mechanism. *Bioresour. Technol.* **275**, 297–306 (2019).
 94. Xu, N., Tan, G., Wang, H. & Gai, X. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure. *Eur. J. Soil Biol.* **74**, 1–8 (2016).
 95. Harter, J. *et al.* Soil biochar amendment shapes the composition of N₂O-reducing microbial communities. *Sci. Total Environ.* **562**, 379–390 (2016).